

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4951527号  
(P4951527)

(45) 発行日 平成24年6月13日 (2012. 6. 13)

(24) 登録日 平成24年3月16日 (2012. 3. 16)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 14/535 (2006. 01)

C O 7 K 14/535 Z N A

C 1 2 P 21/02 (2006. 01)

C 1 2 P 21/02 K

A 6 1 K 38/00 (2006. 01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 P 43/00 1 O 5

A 6 1 P 31/00 (2006. 01)

A 6 1 P 31/00

請求項の数 35 (全 103 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-550570 (P2007-550570)  
 (86) (22) 出願日 平成18年1月10日 (2006. 1. 10)  
 (65) 公表番号 特表2009-501127 (P2009-501127A)  
 (43) 公表日 平成21年1月15日 (2009. 1. 15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/000870  
 (87) 国際公開番号 W02006/074467  
 (87) 国際公開日 平成18年7月13日 (2006. 7. 13)  
 審査請求日 平成21年1月8日 (2009. 1. 8)  
 (31) 優先権主張番号 60/643, 437  
 (32) 優先日 平成17年1月10日 (2005. 1. 10)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/665, 588  
 (32) 優先日 平成17年3月25日 (2005. 3. 25)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 509115384  
 バイオジェネリックス アーゲー  
 ドイツ国, マンハイム 68199, ヤン  
 デルシュトラッセ 3  
 (74) 代理人 100079108  
 弁理士 稲葉 良幸  
 (74) 代理人 100109346  
 弁理士 大貫 敏史  
 (72) 発明者 デフリース, ショーン  
 アメリカ合衆国, ペンシルバニア州 19  
 454, ノース ウェールズ, フィリー  
 ドライブ 126  
 (72) 発明者 クロウゼン, ヘンリック  
 デンマーク国, ディーケー-2840 ホ  
 ルテ, ソエブリンケン 6  
 最終頁に続く

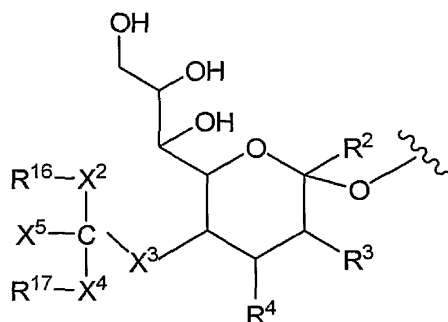
(54) 【発明の名称】 糖PEG化顆粒球コロニー刺激因子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

顆粒球コロニー刺激因子ペプチドであって、前記ペプチドのアミノ酸残基に結合したグリコシル連結基を含んで成り、前記グリコシル連結基が、式

【化 1】



[ 式中、

$R^2$  は  $H$ 、 $CH_2OR^7$ 、 $COOR^7$ 、または  $OR^7$  であり、  
 ここで

$R^7$  は、 $H$ 、置換もしくは非置換アルキル、または置換もしくは非置換ヘテロアル

キルであり、

$R^3$  および  $R^4$  は、H、置換もしくは非置換アルキル、 $OR^8$ 、 $NHC(O)R^9$  から独立して選択されるメンバーであり、

ここで

$R^8$  および  $R^9$  は、H、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、またはシアル酸から独立して選択され、

$X^3$  は、 $S$ 、 $SC(O)NH$ 、 $HNC(O)S$ 、 $SC(O)O$ 、 $O$ 、 $NH$ 、 $NHC(O)$ 、 $(O)CNH$ 、 $NHC(O)O$ 、 $OC(O)NH$ 、 $CH_2S$ 、 $CH_2O$ 、 $CH_2CH_2O$ 、 $CH_2CH_2S$ 、 $(CH_2)_oO$ 、 $(CH_2)_oS$ 、および  $(CH_2)_oY'-PEG$  から選択されるリンケージ断片であり、ここで  $Y'$  は  $S$ 、 $NH$ 、 $NHC(O)$ 、 $C(O)NH$ 、 $NHC(O)O$ 、 $OC(O)NH$ 、または  $O$  であり、 $o$  は 1 ~ 50 の整数であり、

10

$R^{16}$  および  $R^{17}$  は、ポリマー腕から独立して選択され、

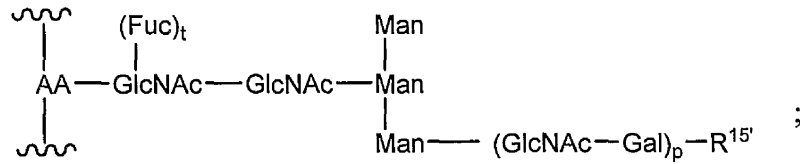
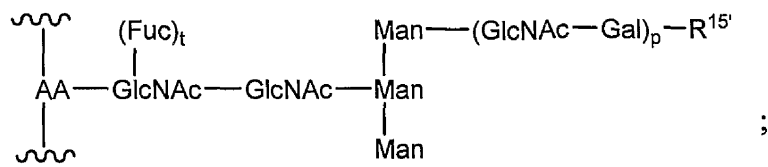
$X^2$  および  $X^4$  は、ポリマー部分  $R^{16}$  および  $R^{17}$  を C に結合する独立して選択されるリンケージ断片であり、

$X^5$  は非反応基である ]

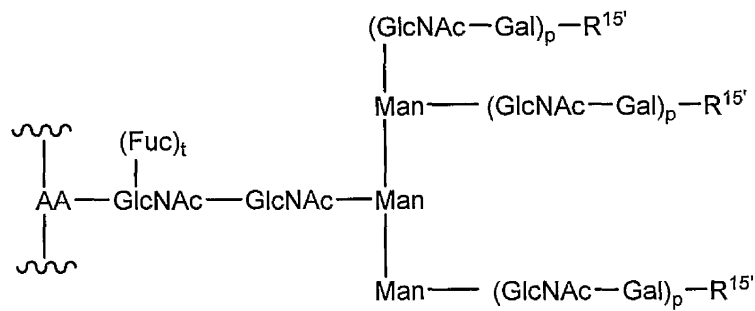
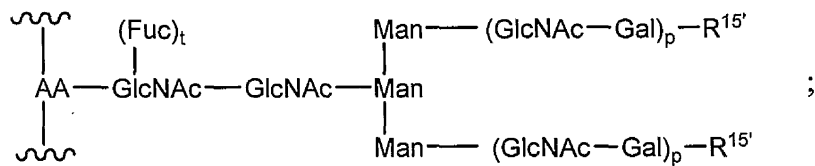
を有する修飾シアリル残基を含んで成り、

前記グリコシル連結基が、

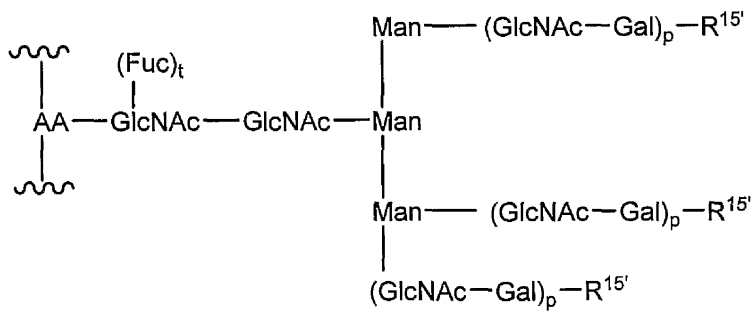
## 【化 2】



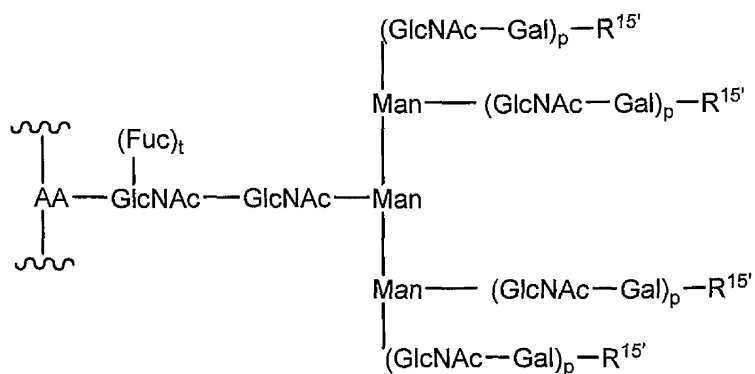
10



20



30



40

およびその組合せから選択される式

50

[ 式中、

A A は前記ペプチドの前記アミノ酸残基であり、

t は 0 または 1 に等しい整数であり、

p は 1 ~ 10 の整数であり、

R<sup>1 5</sup> は、H、OH、シアル酸、前記修飾シアリル残基、および S i a - S i a<sup>p</sup> から選択されるメンバーであり、

ここで、

S i a<sup>p</sup> は前記修飾シアリル残基であり、

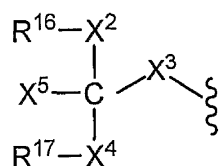
ここで少なくとも 1 つの R<sup>1 5</sup> が前記修飾シアリル残基および S i a - S i a<sup>p</sup> から選択される ]

を有する、顆粒球コロニー刺激因子ペプチド。

【請求項 2】

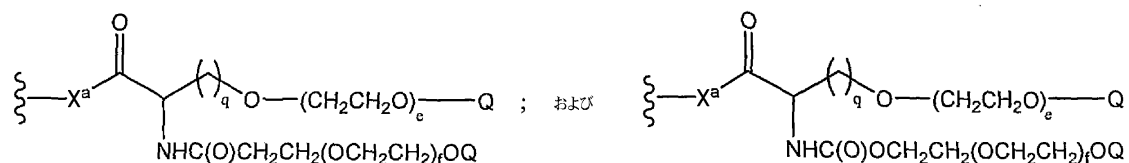
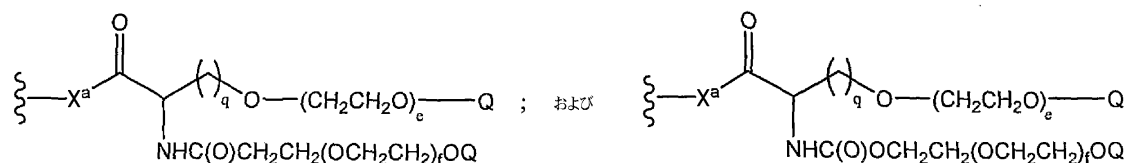
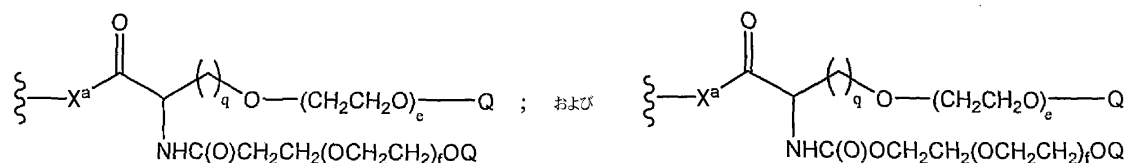
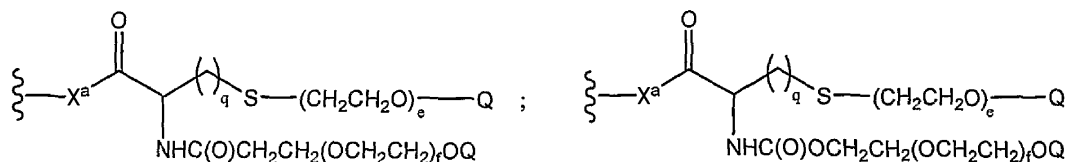
部分

【化 3】



が、

【化 4】



[ 式中、

X<sup>a</sup> は NH であり、

Q は、H、および置換もしくは非置換 C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルから選択され、

e および f は、1 ~ 2500 から独立して選択される整数であり、かつ

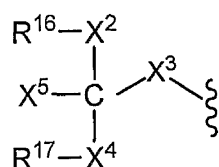
q は、0 ~ 20 の整数である ]

から選択されるメンバーである式を有する請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 3】

部分

【化 5】



が、

10

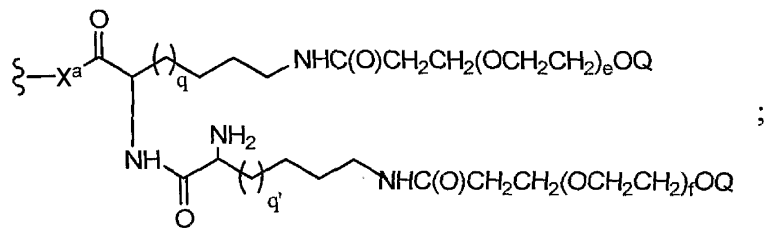
20

30

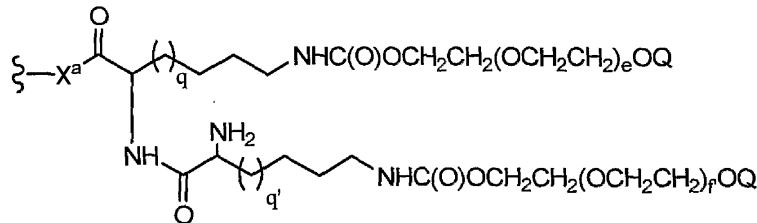
40

50

## 【化 6】

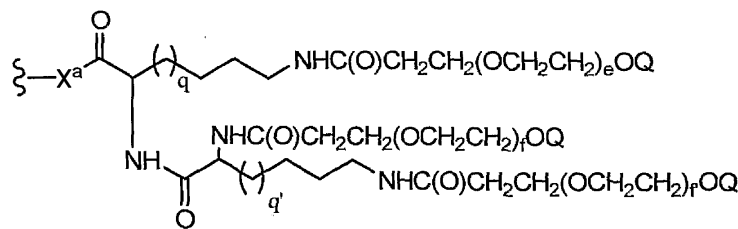


;



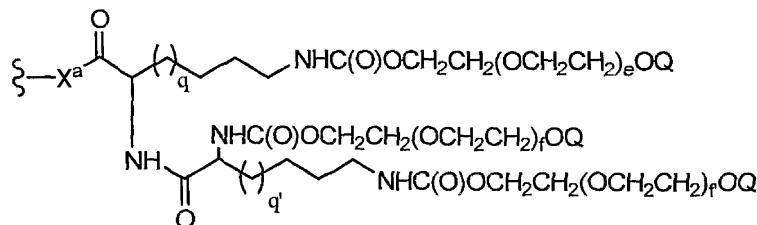
10

;



; および

20



[ 式中、

 $\text{X}^a$  は NH であり、

30

Q は、H、および置換もしくは非置換  $\text{C}_1 - \text{C}_6$  アルキルから選択され、e、f および  $f'$  は、1 ~ 2500 から独立して選択される整数であり、かつq および  $q'$  は、1 ~ 20 から独立して選択される整数である ]

から選択されるメンバーである式を有する、請求項 1 に記載のペプチド。

## 【請求項 4】

前記アミノ酸残基がセリンまたはトレオニンから選択されるメンバーである、請求項 1 に記載の G - C S F ペプチド。

## 【請求項 5】

前記ペプチドが、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の G - C S F ペプチド。

40

## 【請求項 6】

前記アミノ酸残基が、配列番号 1 の位置 133 でトレオニンである、請求項 5 に記載の G - C S F ペプチド。

## 【請求項 7】

前記アミノ酸残基がアスパラギン残基である、請求項 1 に記載のペプチド。

## 【請求項 8】

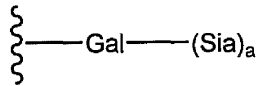
前記ペプチドが生物活性顆粒球コロニー刺激因子ペプチドである、請求項 1 に記載のペプチド。

## 【請求項 9】

( a ) グリコシル部分

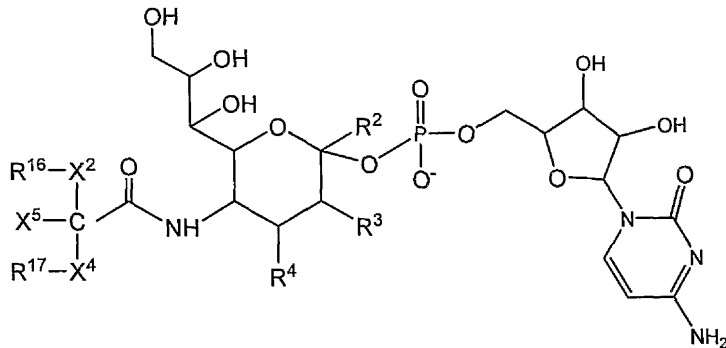
50

## 【化 7】



を含んで成る基質顆粒球コロニー刺激因子ペプチドを、式

## 【化 8】



〔式中、 $a$  は 0 または 1 である〕

を有する P E G - シアル酸ドナーと接触させるステップと、

( b ) ステップ ( a ) からの生成物を、前記ドナーから前記グリコシル部分の G a l または S i a へ P E G - シアル酸を移動させる酵素と、前記移動に適切な条件下に接触させるステップと

を含んで成る、請求項 1 に記載のペプチドを調製する方法。

## 【請求項 1 0】

ステップ ( a ) の前に、

( b ) 適切な宿主において前記基質顆粒球コロニー刺激因子ペプチドを発現させるステップ

をさらに含んで成る、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 1 1】

前記宿主が昆虫細胞および哺乳類細胞から選択される、請求項 1 0 に記載の方法。

## 【請求項 1 2】

前記昆虫細胞がスポドプテラ・フルギペルタ ( *S p o d o p t e r a f r u g i p e r d a* ) 細胞系である、請求項 1 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 3】

哺乳類に投与して、前記哺乳類における炎症性白血球産生を刺激するための医薬製剤を製造するための、請求項 1 に記載のペプチドの使用。

## 【請求項 1 4】

対象に投与して、それを必要とする前記対象における感染を治療するための医薬製剤を製造するための、前記対象における状態を緩和するために有効な量の請求項 1 に記載のペプチドの使用。

## 【請求項 1 5】

請求項 1 に記載の顆粒球コロニー刺激因子ペプチド、および医薬的に許容される担体を含んで成る医薬製剤。

## 【請求項 1 6】

顆粒球コロニー刺激因子ペプチドであって、前記ペプチドのアミノ酸残基に結合したグリコシル連結基を含んで成り、前記グリコシル連結基が、式

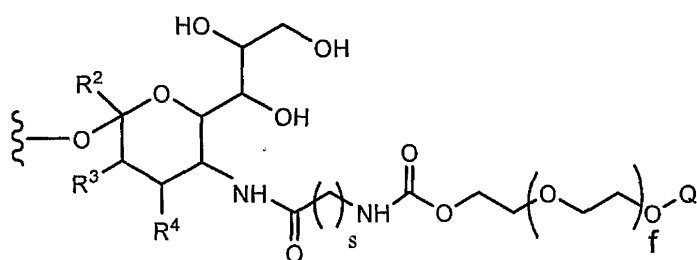
10

20

30

40

## 【化 9】



10

[ 式中、

$R^2$  は  $H$ 、 $CH_2OR^7$ 、 $COOR^7$ 、 $COO^-$  または  $OR^7$  であり、

ここで

$R^7$  は、 $H$ 、置換もしくは非置換アルキル、または置換もしくは非置換ヘテロアルキルであり、

$R^3$  および  $R^4$  は、 $H$ 、置換もしくは非置換アルキル、 $OR^8$ 、 $NHC(O)R^9$  から独立して選択されるメンバーであり、

ここで

$R^8$  および  $R^9$  は、 $H$ 、置換もしくは非置換アルキル、または置換もしくは非置換ヘテロアルキル、またはシアル酸から独立して選択され、

20

$s$  は 1 ~ 20 の整数であり、

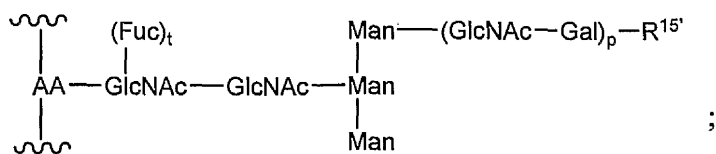
$f$  は 1 ~ 2500 の整数であり、かつ

$Q$  は  $H$  および置換もしくは非置換  $C_1 - C_6$  アルキルから選択されるメンバーである ]

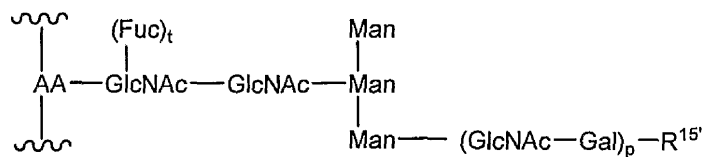
を有する修飾シアリル残基を含んで成り、

前記グリコシル連結基が、

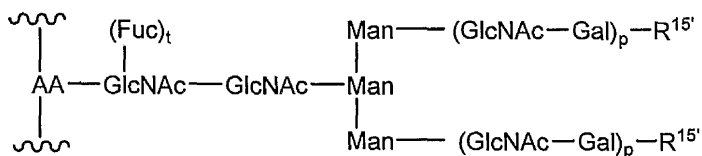
【化 10】



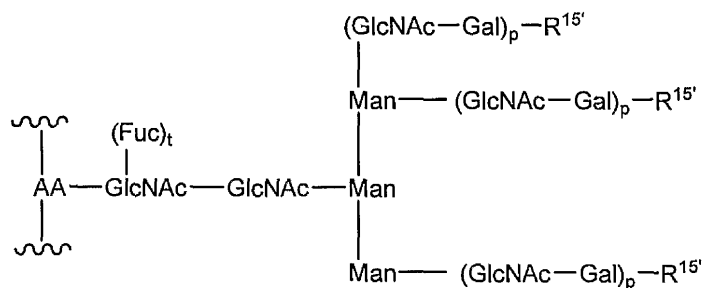
;



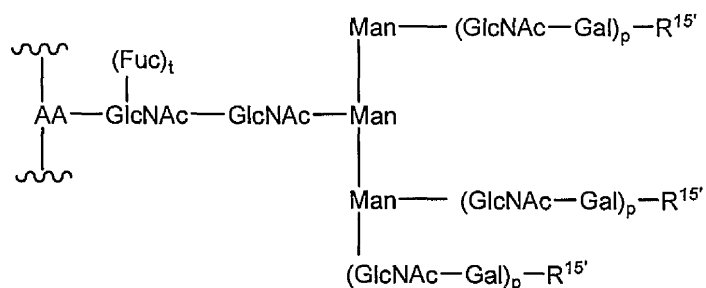
;



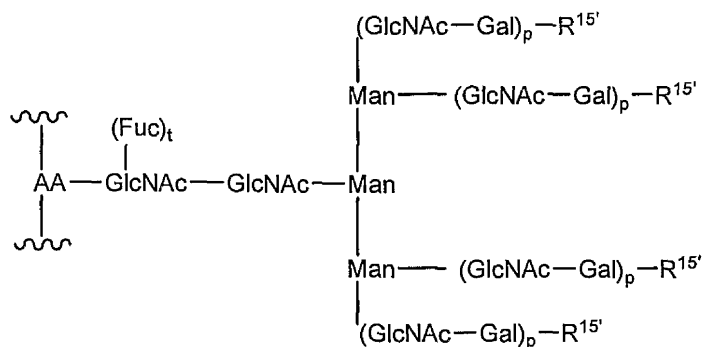
;



;



; および



およびその組合せから選択される式

〔式中、

A A は前記ペプチドの前記アミノ酸残基であり、

t は 0 または 1 に等しい整数であり、

10

20

30

40

50



p は 1 ~ 10 の整数であり、  
R<sup>1-5</sup> は、H、OH、シアル酸、前記修飾シアリル残基、および Sia-Sia<sup>p</sup> から  
選択されるメンバーであり、  
ここで、  
Sia<sup>p</sup> は前記修飾シアリル残基であり、  
ここで少なくとも 1 つの R<sup>1-5</sup> が前記修飾シアリル残基および Sia-Sia<sup>p</sup> から  
選択される]

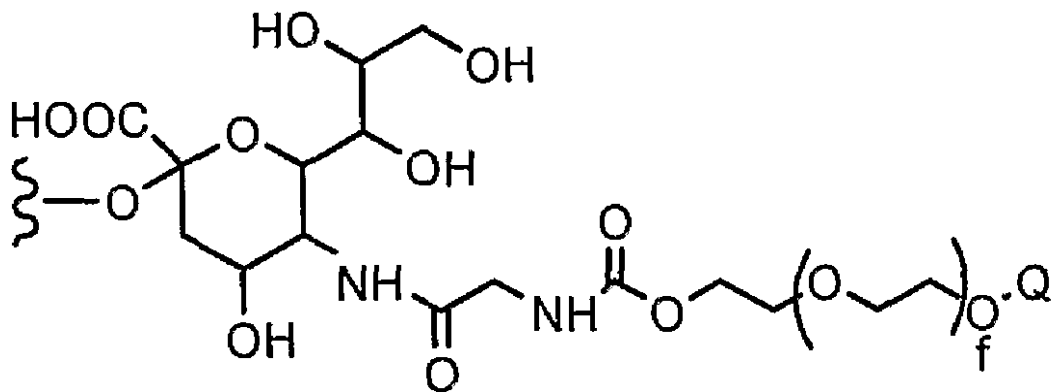
を有する、顆粒球コロニー刺激因子ペプチド。

【請求項 17】

前記修飾シアリル残基が式

【化 11】

10



20

を有する、請求項 16 に記載のペプチド。

【請求項 18】

Q が H および C H<sub>3</sub> から選択される、請求項 16 に記載のペプチド。

【請求項 19】

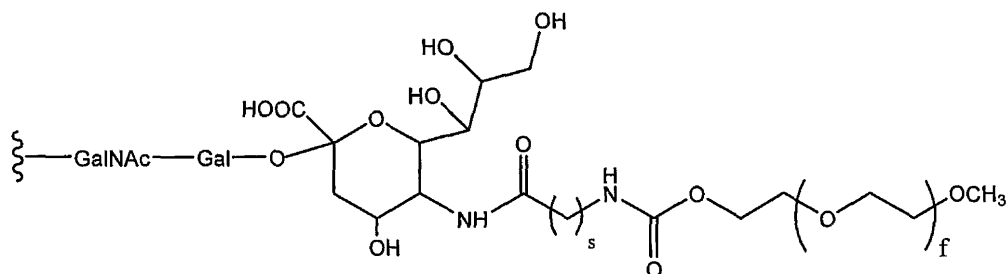
前記アミノ酸残基がアスパラギンである、請求項 16 に記載のペプチド。

【請求項 20】

前記グリコシル連結基が式

【化 12】

30



40

を含んで成る、請求項 16 に記載のペプチド。

【請求項 21】

s が 1 であり、f が 200 ~ 300 の整数である、請求項 20 に記載のペプチド。

【請求項 22】

前記アミノ酸残基がセリンまたはトレオニンから選択されるメンバーである、請求項 16 に記載のペプチド。

【請求項 23】

50

前記ペプチドが配列番号 1 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 6 に記載のペプチド。

【請求項 2 4】

前記アミノ酸残基が配列番号 1 の位置 1 3 3 におけるトレオニンである、請求項 2 3 に記載のペプチド。

【請求項 2 5】

前記ペプチドが配列番号 2 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 6 に記載のペプチド。

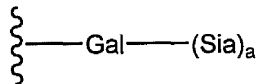
【請求項 2 6】

前記アミノ酸残基が配列番号 2 の位置 1 3 4 におけるトレオニンである、請求項 2 5 に記載のペプチド。

【請求項 2 7】

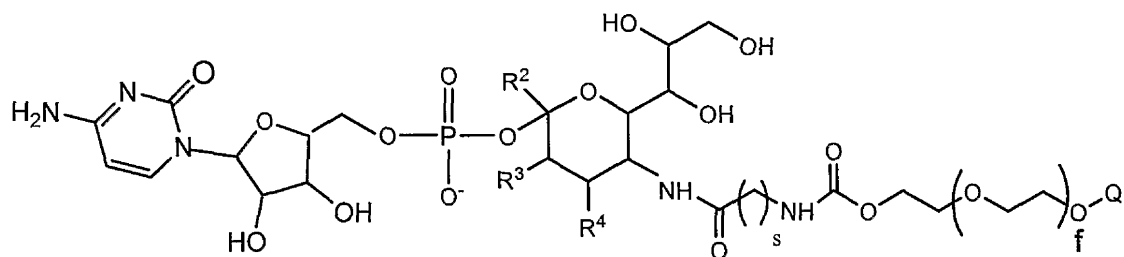
( a ) グリコシル部分

【化 1 3】



を含んで成る基質顆粒球コロニー刺激因子ペプチドを、式

【化 1 4】



[ 式中、a は 0 または 1 である ]

を有する P E G - シアル酸ドナーと接触させるステップと、

( b ) ステップ ( a ) からの生成物を、前記ドナーから前記グリコシル部分の G a l または S i a P E G - シアル酸を移動させる酵素と、前記移動に適切な条件下に接触させるステップと

を含んで成る、請求項 1 6 に記載の顆粒球コロニー刺激因子ペプチドを調製する方法。

【請求項 2 8】

ステップ ( a ) の前に、

( b ) 適切な宿主において前記基質顆粒球コロニー刺激因子ペプチドを発現させるステップ

をさらに含んで成る、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記宿主が昆虫細胞である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記昆虫細胞が、スポドプテラ・フルギベルタ ( *S p o d o p t e r a f r u g i p e r d a* ) 細胞系である、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記ペプチドをメチオニンと接触させるステップをさらに含んで成る、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 2】

ステップ ( b ) の後に、前記ペプチドを精製するステップをさらに含んで成り、遊離メチオニンが前記精製するステップ中に存在する、請求項 2 7 に記載の方法。

**【請求項 3 3】**

哺乳類に投与して、前記哺乳類における炎症性白血球産生を刺激するための医薬製剤を製造するための、請求項 1 6 に記載のペプチドの使用。

**【請求項 3 4】**

対象に投与して、それを必要とする前記対象における感染を治療するための医薬製剤を製造するための、前記対象における状態を緩和する有効な量の請求項 1 6 に記載のペプチドの使用。

**【請求項 3 5】**

請求項 1 6 に記載の顆粒球コロニー刺激因子ペプチド、および医薬的に許容される担体を含んで成る医薬製剤。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

関連出願の相互参照

本出願は、2005年1月10日出願の米国仮特許出願第60/643,437号明細書、2005年3月24日出願の米国仮特許出願第60/665,588号明細書、2005年4月22日出願の米国仮特許出願第60/674,199号明細書、2005年5月25日出願の米国仮特許出願第60/684,851号明細書、および2005年6月23日出願の米国特許出願第11/166,404号明細書の利点を請求するが、その各々はすべての目的のためにその全体が参照により本明細書で援用される。

**【背景技術】****【0002】**

発明の背景

顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)は、好中球顆粒球前駆細胞および成熟好中球の生存、増殖、分化、および機能を刺激する糖タンパク質である。臨床的使用における組換えヒトG-CSFの2つの形態は好中球顆粒球形成の強力な刺激因子であり、一部の好中球減少状態の感染性合併症の予防における有効性が明らかにされた。それらは骨髄抑制療法からの好中球回復を加速するために使用されうる。

**【0003】**

G-CSFは、熱性好中球減少症の発生率を削減することによって癌化学療法の死亡率、骨髄移植によって支持される高用量化学療法の死亡率、および重篤な慢性好中球減少症患者における感染の発生率と持続期間を減少させる。さらに、G-CSFは最近、心筋梗塞の発症後に投与されると治療的であることが証明されている。

**【0004】**

G-CSFのヒト形態は、1986年に日本および米国のグループによってクローン化された(例えば、ナガタ(Nagata)ら、Nature 319:415-418頁、1986年を参照)。天然ヒト糖タンパク質は、1つは175アミノ酸およびもう1つは178アミノ酸である、2つの形態で存在する。より豊富かつより活性の175アミノ酸の形態は、組換えDNA技術によって医薬品の開発において使用されている。

**【0005】**

大腸菌(E.coli)発現系において合成される組換えヒトG-CSFはフィルグラスチムと呼ばれる。フィルグラスチムの構造は、天然糖タンパク質とわずかに異なる。組換えヒトG-CSFの他の形態はレノグラスチムと呼ばれ、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞で合成される。

**【0006】**

hG-CSFは、2つのG-CSF分子および2つの受容体の2:2の複合体の形成によってG-CSF受容体を二量体化するモノマータンパク質である(ホラン(Horan)ら、Biochemistry、35(15)、4886-96頁(1996年))。次のhG-CSF残基は、受容体結合インターフェイスの一環であるX線結晶方位試験によって同定されている。すなわち、G4、P5、A6、S7、S8、L9、P10、Q1

10

20

30

40

50

1、S12、L15、K16、E19、Q20、L108、D109、D112、T115、T116、Q119、E122、E123、およびL124（例えば、アリティミ（Aritomi）ら、（1999年）Nature 401：713頁を参照）。

【0007】

r h G - C S F の市販形態は短期薬理効果を有し、白血球減少状態の持続期間のためにしばしば1日1回より多く投与される必要がある。長い循環半減期を有する分子が、白血球減少症を緩和し、結果として起こる感染を予防するために必要な投与回数を減少させる。現在入手可能なr G - C S F 生成物の別の問題が、用量依存骨痛の発生である。骨痛はr G - C S F による治療の重大な副作用として患者によって経験されるため、この作用を本質的に有さず、または骨痛がもたらされない十分に少用量で有効である生成物によって骨痛をもたらしことがないr G - C S F 生成物を提供することが望ましい。したがって、改善された組換えG - C S F 分子が明らかに必要である。

10

【0008】

h G - C S F のタンパク質工学による変異形が報告されている（米国特許第5,581,476号明細書、米国特許第5,214,132号明細書、米国特許第5,362,853号明細書、米国特許第4,904,584号明細書、およびリードハール・オルソン（Riedhaar-Olson）ら、Biochemistry 35：9034-9041頁、1996年）。天然ポリペプチドと比べ少なくとも1つの追加の炭水化物鎖を導入するためのh G - C S F および他のポリペプチドの修飾も報告されている（米国特許第5,218,092号明細書）。また、PEG基の結合を含む天然h G - C S F のポリマー修飾が報告され、試験されている（例えば、サタケ-イシカワ（Satake-Is hikawa）ら（1992年）、Cell Structure and Function 17：157頁、ボーエン（Bowen）ら（1999年）Experimental Hematology 27：425頁、米国特許第5,824,778号明細書、米国第5,824,784号明細書、国際公開第96/11953号パンフレット、国際公開第95/21629号パンフレット、および国際公開第94/20069号パンフレットを参照）。

20

【0009】

糖タンパク質治療薬の薬物動態特性を改善する試みにおけるペプチド骨格への合成ポリマーの結合は当業界で周知である。ペプチドにコンジュゲートされている代表的なポリマーがポリ（エチレングリコール）（「PEG」）である。ペプチド治療薬を誘導体化するPEGの使用は、ペプチドの免疫原性を削減することが明らかにされている。例えば、米国特許第4,179,337号明細書（デービス（Davis）ら）は、ポリエチレングリコール（PEG）またはポリプロピレングリコールと結合される酵素およびペプチドホルモンなどの非免疫原性ポリペプチドを開示している。免疫原性の削減に加えて、循環におけるクリアランス時間は、問題のポリペプチドのPEGコンジュゲートのサイズの増大により延長する。

30

【0010】

PEG、およびその誘導体のペプチドへの結合の主要な様態は、ペプチドアミノ酸残基による非特異的結合である（例えば、米国特許第4,088,538号明細書、米国特許第4,496,689号明細書、米国特許第4,414,147号明細書、米国特許第4,055,635号明細書、およびPCT国際公開第87/00056号パンフレットを参照）。PEGをペプチドへ結合させる別の様態が、糖ペプチド上のグリコシル残基の非特異的酸化によるものである（例えば、国際公開第94/05332号パンフレットを参照）。

40

【0011】

これらの非特異的方法において、ポリ（エチレングリコール）が無作為、非特異的な方法でペプチド骨格上の反応残基に添加される。もちろん、PEG分子の無作為添加は、最終生成物の均質性の欠如、およびペプチドの生物または酵素活性における削減の可能性を含む、その不利点を有する。したがって、治療的ペプチドの生成のために、結果として、

50

特異的に標識され、容易に特徴づけ可能であり、基本的に同種生成物をもたらす誘導体化法が優れている。かかる方法は開発されている。

#### 【0012】

特異的に標識される同種ペプチド治療薬が、酵素の作用によりインビトロで生成される。合成ポリマーまたは他の標識をペプチドへ結合させるための代表的な非特異的方法とは異なり、酵素ベースの合成が位置選択性および立体選択性の利点を有する。標識ペプチドの合成において使用されるための2つの主要なクラスの酵素が、グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、シアリルトランスフェラーゼ、オリゴ糖転移酵素、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ）、およびグリコシダーゼである。これらの酵素は糖の特異的結合のために使用されうるが、これはその後には治療的部分を含んで成るように修飾されうる。あるいは、グリコシルトランスフェラーゼおよび修飾グリコシダーゼを使用し、修飾糖をペプチド骨格へ直接移動させることができる（例えば、その各々が本明細書で参照により援用される、米国特許第6,399,336号明細書、および米国特許出願公開第20030040037号明細書、同第20040132640号明細書、同第20040137557号明細書、同第20040126838号明細書、および20040142856号明細書を参照）。化学および酵素双方の合成要素を組み合わせる方法も周知である（例えば、参照により本明細書で援用される、ヤマモト（Yamamoto）ら、Carbohydr. Res. 305:415-422頁（1998年）、および米国特許出願公開第20040137557号明細書を参照）。

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0013】

改善された治療的G - C S Fの必要に応じて、本発明は、治療的に活性であり、同一の、または糖PEG化（glycopegylated）されていない密接に類似したG - C S Fペプチドに対して改善されている薬物動態パラメータおよび特性を有する糖PEG化G - C S Fを提供する。さらに、本発明は、費用効果的にかつ工業規模で本発明の改善されたG - C S Fを製造するための方法を提供する。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0014】

#### 発明の概要

現在、1つもしくはそれ以上のポリ（エチレングリコール）部分による顆粒球コロニー刺激因子（G - C S F）の制御修飾は、対応する天然（非PEG化）G - C S Fに対して改善されている薬物動態特性を有する新規G - C S F誘導体を提供することが見出されている（図3）。さらに、糖PEG化G - C S Fの薬理活性は、市販のモノPEG化フィルグラスチムとほぼ同じである（図4）。

#### 【0015】

代表的な実施形態において、本発明の「糖PEG化」G - C S F分子が、グリコシル化または未グリコシル化G - C S Fペプチドと、その構造内にポリ（エチレングリコール）部分を含む酵素的に移動可能なサッカリール（saccharyl）部分との間のコンジュゲートの酵素媒介形成によって生成される。PEG部分はサッカリール部分に直接（すなわち、2つの反応基の反応によって形成される単一基により）またはリンカー部分、例えば、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル等により結合される。代表的な移動可能なPEGサッカリール構造が図5に記載されている。

#### 【0016】

したがって、1つの態様において、本発明は、PEG部分、例えば、PEGと、当該技術分野において承認されているG - C S Fと同様または類似のインビボ活性を有するペプチドとのコンジュゲートを提供する。本発明のコンジュゲートにおいて、PEG部分は無傷グリコシル連結基によってペプチドに共有的に結合している。代表的な無傷グリコシル連結基は、PEGで誘導体化されるシアル酸部分を含む。

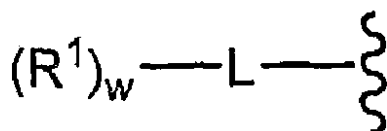
#### 【0017】

ポリマー修飾部分は G - C S F のグリコシル部分の任意の位置で結合されうる。さらに、ポリマー修飾部分は、野生型または変異 G - C S F ペプチドのアミノ酸配列における任意の位置でグリコシル残基に結合される。

【 0 0 1 8 】

代表的な実施形態において、ポリマー修飾部分は、一般にグリコシルコア上のヘテロ原子（例えば、N、O）により、以下

【 化 1 】



10

[ 式中、 $R^1$  はポリマー修飾基であり、 $L$  は結合および連結基から選択される。指数  $w$  は 1 - 6、好ましくは 1 - 3、より好ましくは 1 - 2 から選択される整数である ] に示されるように、リンカー、 $L$  によりグリコシル連結基と結合される。代表的な連結基としては、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル部分、およびシアル酸が挙げられる。リンカーの代表的な成分がアシル部分である。別の代表的な連結基がアミノ酸残基である（例えば、システイン、セリン、リシン、および短いオリゴペプチド、例えば、L y s - L y s、L y s - L y s - L y s、C y s - L y s、S e r - L y s、等）。

20

【 0 0 1 9 】

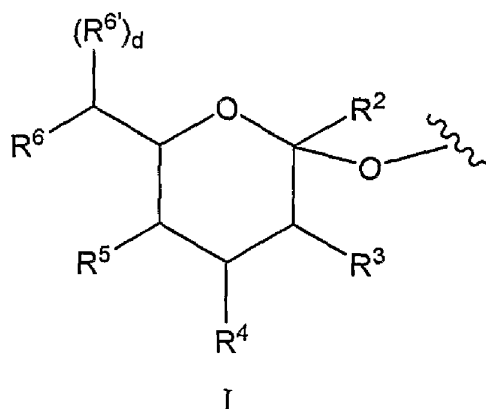
$L$  が結合である場合、これは  $R^1$  の前駆体に対する反応官能基およびグリコシル連結基の前駆体に対する相補的反応性の反応官能基の反応によって形成される。 $L$  が非ゼロ順位の連結基である場合、 $L$  は  $R^1$  前駆体との反応前にグリコシル部分上の適所にありうる。あるいは、 $R^1$  の前駆体および  $L$  が、その後にグリコシル部分に結合される前もって作られたカセットに組み込まれる。本明細書に記載されているように、適切な反応官能基を有する前駆体の選択および調製は当業者の能力の範囲内である。さらに、前駆体の結合は当該技術分野で十分に理解されている化学反応によって継続する。

30

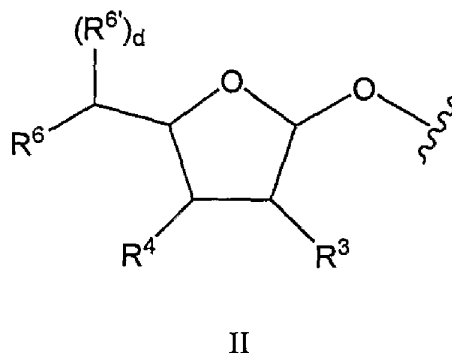
【 0 0 2 0 】

代表的な実施形態において、本発明は、ポリマー修飾部分とのグリコシル連結基によりコンジュゲートされる G - C S F ペプチドを提供する。代表的な G - C S F ペプチドコンジュゲートとしては、

【 化 2 】



；および



40

から選択される式を有するグリコシル連結基が挙げられる。

50

## 【 0 0 2 1 】

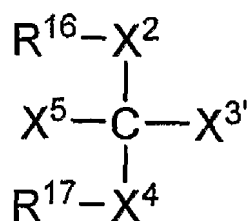
式 I および I I において、 $R^2$  は  $H$ 、 $CH_2OR^7$ 、 $COOR^7$ 、 $COO^-M^+$ 、または  $OR^7$  であり、ここで  $R^7$  は  $H$ 、置換もしくは非置換アルキル、または置換もしくは非置換ヘテロアルキルを表す。記号  $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$  および  $R^{6'}$  は独立して  $H$ 、置換もしくは非置換アルキル、 $OR^8$ 、 $NHC(O)R^9$  を表す。 $M^+$  は金属である。指数  $d$  は 0 または 1 である。 $R^8$  および  $R^9$  は独立して  $H$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、またはシアル酸から選択される。 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、または  $R^{6'}$  の少なくとも 1 つは、ポリマー修飾部分、例えば、PEG を含む。代表的な実施形態において、 $R^6$  および  $R^{6'}$  は、それらが結合されている炭素とともに、シアリル部分の側鎖の成分である。さらに代表的な実施形態において、この側鎖はポリマー修飾部分で官能化される。

10

## 【 0 0 2 2 】

本明細書で論じるように、本発明のコンジュゲートにおいて使用される PEG は線状または分岐でありうる。本発明の本実施形態に記載のペプチドコンジュゲートを含有する分岐 PEG を形成する使用の代表的な前駆体は、式

## 【 化 3 】



20

(III)

を有する。本式に記載の分岐ポリマー種は基本的に純粋な水溶性ポリマーである。 $X^{3'}$  は、イオン性（例えば、 $OH$ 、 $COOH$ 、 $H_2PO_4$ 、 $H_2SO_3$ 、 $NH_2$ 、およびその塩など）または他の官能基、例えば、下記を含む部分である。 $C$  は炭素である。 $X^5$ 、 $R^{16}$ 、および  $R^{17}$  は独立して非反応基（例えば、 $H$ 、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル）およびポリマー腕（例えば、PEG）から選択される。 $X^2$  および  $X^4$  は、好ましくは、同じまたは異なりうる、生理的条件下に基本的に非反応であるリンケージ断片である。代表的なリンカーは芳香族部分もエステル部分も含まない。あるいは、これらのリンケージは、生理的に関連性のある条件下に、分解するようにデザインされる 1 つもしくはそれ以上の部分、例えば、エステル、ジスルフィド等を含みうる。 $X^2$  および  $X^4$  は、ポリマー腕  $R^{16}$  および  $R^{17}$  を  $C$  に結合する。 $X^{3'}$  がリンカー、糖、またはリンカー-糖カセットに対する相補的反応性の反応官能基と反応すると、 $X^{3'}$  はリンケージ断片  $X^3$  の成分に変換される。

30

## 【 0 0 2 3 】

本発明の他の目的および利点は、次の詳細な説明から当業者に明らかであろう。

## 【 発明を実施するための最良の形態 】

## 【 0 0 2 4 】

40

発明の詳細な説明および好ましい実施形態  
略語

PEG、ポリ(エチレングリコール)、PPG、ポリ(プロピレングリコール)、Ar、アラビノシル、Fru、フルクトシル、Fuc、フコシル、Gal、ガラクトシル、GalNAc、N-アセチルガラクトサミニル、Glc、グルコシル、GlcNAc、N-アセチルグリコサミニル、Man、マンノシル、ManAc、マンノサミニルアセテート、Xyl、キシロシル、NeuAc、シアリルまたはN-アセチルノイラミニル、Sia、シアリルまたはN-アセチルノイラミニル、M6P、マンノース-6-リン酸、およびその誘導体と類似体。

## 【 0 0 2 5 】

50

## 定義

特に別の規定がない限り、本明細書で使用されるすべての技術および学術用語は一般に、本発明が属する当業者によって一般的に理解されている同じ意味を有する。一般に、本明細書で使用される用語、および細胞培養、分子遺伝学、有機化学反応および核酸化学反応、およびハイブリダイゼーションにおける実験室手順は、当技術分野で公知であり、かつ一般的に使用されているものである。標準方法は核酸およびペプチド合成に使用されている。方法および手順は、一般に当技術分野における従来の方法およびさまざまな一般の文献（一般に、参照により本明細書で援用される、サンプルック（Sambrook）ら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版（1989年）コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）、Cold Spring Harbor、ニューヨーク州（N.Y.）を参照）に従い実行されるが、これらは本文書の全体を通じて提供される。本明細書で使用される用語および分析的化学反応における実験手順、および書きの有機合成は、当技術分野で公知のものであり、一般的に使用されている。標準方法、またはその修正が化学合成および化学分析に使用される。

10

## 【0026】

すべての（本明細書に記載の）オリゴ糖は、非還元サッカリド（すなわち、Gal）の名称および略語の後、グリコシド結合（または）、環結合（1または2）、結合に関与する還元サッカリドの環位置（2、3、4、6、または8）、および次いで還元サッカリドの名称または略語（すなわち、GlcNAc）で記載されている。各々のサッカリドは、好ましくは、ピラノースである。標準の糖鎖生物学用語の検討には、Essentials of Glycobiology バルキ（Varki）ら編、CSHLプレス（Press）（1999年）を参照。

20

## 【0027】

オリゴ糖は、還元末端でのサッカリドが実際に還元糖であるかどうかに関係なく、還元末端および非還元末端を有するとみなされる。一般に認められた用語に従って、オリゴ糖は本明細書では左に非還元末端、右に還元末端を有するように描かれる。

## 【0028】

「シアル酸」という語は、9個の炭素のカルボキシル化糖のファミリーのいずれかのメンバーを指す。シアル酸ファミリーの最も一般的なメンバーは、N-アセチル-ノイラミン酸（2-ケト-S-アセトアミド-3,5-ジデオキシ-D-グリセロ-D-ガラクトノヌロピラノース-1-オン酸（しばしばNeu5Ac、NeuAc、またはNANAと略される）。ファミリーの第2のメンバーが、N-グリコールイル-ノイラミン酸（Neu5GcまたはNeuGc）であり、ここでNeuAcのN-アセチル基はヒドロキシル化されている。第3のシアル酸ファミリーのメンバーが、2-ケト-3-デオキシ-ノヌロソン酸（KDN）である（ナダノ（Nadano）ら（1986年）J Biol. Chem. 261: 11550-11557頁、カナモリ（Kanamori）ら、J. Biol. Chem. 265: 21811-21819頁（1990年）。9-O-ラクチル-Neu5Acまたは9-O-アセチル-Neu5Acのような9-O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アシル-Neu5Ac、9-デオキシ-9-フルオロ-Neu5Acおよび9-アジド-9-デオキシ-Neu5Acなどの9-置換シアル酸も含まれる。シアル酸ファミリーの検討のためには、例えば、バルキ（Varki）、Glycobiology 2: 25-40頁（1992年）、Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function、R. Schauer編（シュプリンガー-フェアラーク（Springer-Verlag）、New York（1992年）を参照。シアリル化法におけるシアル酸化合物の合成および使用は、1992年10月1日刊行の国際公開第92/16640号パンフレットで開示されている。

30

40

## 【0029】

「ペプチド」は、モノマーがアミノ酸であり、アミド結合により結合され、あるいはボ

50



リペプチドと呼ばれるポリマーを指す。また、非天然アミノ酸、例えば、 $\alpha$ -アラニン、フェニルグリシン、およびホモアルギニンも含まれる。遺伝子符号化されていないアミノ酸も本発明において使用されうる。さらに、反応基、グリコシル化部位、ポリマー、治療的部分、生体分子などを含むように修飾されているアミノ酸も本発明において使用されうる。本発明で使用されるアミノ酸のすべては、D-またはL-異性体のいずれかでありうる。L-異性体が一般に好ましい。また、他のペプチド模倣剤も本発明において有用である。本明細書で使用される「ペプチド」は、グリコシル化および未グリコシル化の両方のペプチドを指す。ペプチドを発現する系によって不完全にグリコシル化されるペプチドも含まれる。一般の検討のためには、スパトラ (Spatola), A. F., CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. ワインシュタイン (Weinstein) 編、マルセル・デッカー (Marcel Dekker), New York, 267頁 (1983年) を参照。

10

#### 【0030】

「ペプチドコンジュゲート」という語は、本明細書に記載されているように、ペプチドが修飾糖でコンジュゲートされている本発明の種を指す。

#### 【0031】

「アミノ酸」という語は、天然起源および合成アミノ酸のほか、天然起源アミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣剤を指す。天然起源アミノ酸は、遺伝子コードによって符号化されたもの、および後で修飾されるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、 $\alpha$ -カルボキシグルタミン酸塩、およびO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体は、天然アミノ酸と同じ基本的な化学構造、すなわち、水素に結合されている炭素、カルボキシル基、アミノ酸、およびR基、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。かかる類似体は、修飾R基 (例えば、ノルロイシン) または修飾ペプチド骨格を有するが、天然起源アミノ酸と同じ基本的な化学構造を保持する。アミノ酸模倣剤は、アミノ酸の一般化学構造と異なるが、天然起源アミノ酸と同様の方法で機能する化学化合物を指す。

20

#### 【0032】

本明細書で使用される「修飾糖」という語は、本発明の工程においてペプチドのアミノ酸またはグリコシル残基へ酵素的に添加される天然または非天然起源炭水化物を指す。修飾糖は、糖ヌクレオチド (一、二、および三リン酸)、活性化糖 (例えば、グリコシルハロゲン化物、メシル酸グリコシル)、および活性化されてもヌクレオチドでもない糖を含むが、これらに限定されない酵素基質から選択される。「修飾糖」は「修飾基」と共有官能化されている。有用な修飾基としては、PEG部分、治療的部分、診断的部分、生体分子などが挙げられるが、これらに限定されない。修飾基は、好ましくは、天然起源、または非修飾炭水化物ではない。修飾基による官能化の位置は、「修飾糖」がペプチドへ酵素的に添加されることがないように選択される。

30

#### 【0033】

「水溶性」という語は、いくらかの検出可能な程度の水中溶解度を有する部分を指す。水溶性を検出および/または定量化する方法は当業界で公知である。代表的な水溶性ポリマーとしては、ペプチド、サッカリド、ポリ (エーテル)、ポリ (アミン)、ポリ (カルボン酸) などが挙げられる。ペプチドは、単一アミノ酸、例えば、ポリ (リシン) から成る混合配列を有しうる。代表的なポリサッカリドがポリ (シアル酸) である。代表的なポリ (エーテル) がポリ (エチレングリコール) である。ポリ (エチレンジイミン) は代表的なポリアミンであり、かつポリ (アクリル) 酸は代表的なポリ (カルボン酸) である。

40

#### 【0034】

水溶性ポリマーのポリマー骨格はポリ (エチレングリコール) (すなわち、PEG) でありうる。しかし、他の関連ポリマーも本発明の実施における使用に適切であり、PEGまたはポリ (エチレングリコール) という語の使用はこの点で包括的であり、排他的ではないことが意図されていると理解すべきである。PEGという語は、アルコキシPEG、

50

二官能性 PEG、多腕 PEG、フォーク状 PEG、分岐 PEG、懸垂（ペンダント、pendent）PEG（すなわち、ポリマー骨格に懸垂する 1 つもしくはそれ以上の官能基を有する PEG または関連ポリマー）、またはその中に分解性リンケージを有する PEG を含むその形態のいずれかにポリ（エチレングリコール）を含む。

#### 【0035】

ポリマー骨格は線状または分岐でありうる。分岐ポリマー骨格は一般に当業界で周知である。一般的に、分岐ポリマーは中心分岐コア部分および中心分岐コアに連結した複数の線状ポリマー鎖を有する。PEG は、グリセロール、ペンタエリトリトール、およびソルビトールなどさまざまなポリオールへのエチレンオキシドの添加によって調製されうる分岐形態で一般的に使用される。中心分岐部分は、リシンなど一部のアミノ酸由来でもありうる。分岐ポリ（エチレングリコール）は、 $R(-PEG-OH)_m$  として一般形態で表されうるが、ここで R はグリセロールまたはペンタエリトリトールなどのコア部分を表し、m は腕の数を表す。参照により全体として本明細書で援用される、米国特許第 5,932,462 号明細書に記載されているものなど多腕 PEG 分子もポリマー骨格として使用されうる。

#### 【0036】

多くの他のポリマーも本発明に適切である。非ペプチド性および水溶性であり、2 ~ 300 個の末端を有するポリマー骨格が、本発明において特に有用である。適切なポリマーの実施例としては、ポリ（プロピレングリコール）（「PPG」）など他のポリ（アルキレングリコール）、エチレングリコールおよびプロピレングリコールなどのコポリマー、参照により全体として本明細書で援用される米国特許第 5,629,384 号明細書に記載されているものなどのポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィンアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシプロピルメタクリルアルニド）、ポリ（-ヒドロキシ酸）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリ（N-アクリルオイルモルフォリン）、およびコポリマー、テルポリマー、およびその混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ポリマー骨格の各々の鎖の分子量は変動しうるが、一般的には約 100 Da ~ 約 100,000 Da、しばしば約 6,000 Da ~ 約 80,000 Da の範囲である。

#### 【0037】

ペプチド薬剤を患者に投与するステップとの関連で「濃度曲線下面積」または「AUC」は、ゼロ ~ 無限の時間の関数として患者における全身循環の濃度を述べる全濃度曲線下面積と定義される。

#### 【0038】

ペプチド薬剤を患者に投与するステップとの関連で本明細書で使用される「半減期」または「 $t_{1/2}$ 」という語は、患者における薬剤の血漿濃度が半分に削減されるために必要とされる時間と定義される。多数のクリアランス機序、再分布、および当業界で公知の他の機序によってペプチド薬剤に関連する 2 つ以上の半減期がありうる。通常、アルファおよびベータ半減期が定義され、アルファ相は再分布と関係があり、ベータ相がクリアランスと関係があるようになっている。しかし、大部分、血流に限定されるタンパク質薬剤には、少なくとも 2 つのクリアランス半減期がありうる。一部のグリコシル化ペプチドについては、急速なベータ相クリアランスは、末端のガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、マンノース、またはフコースを認識するマクロファージ、または内皮細胞上の受容体によって媒介されうる。緩徐なベータ相クリアランスは、有効半径 2 nm 未満（ほぼ 68 kD）の分子の腎系球体ろ過、および / または組織における特異的もしくは非特異的取込みおよび代謝によって起こりうる。糖 PEG 化は、末端の糖（例えば、ガラクトースまたは N-アセチルガラクトサミン）を制限し、それによって、これらの糖を認識する受容体によって急速なアルファ相クリアランスを阻止しうる。これはより大きな有効半径を与え、それによって分布および組織取込みの容積を減少させ、それによって遅発ベータ相を延長しうる。したがって、アルファ相およびベータ相半減期に対する糖 PEG 化の正確な影響は、当業界で公知であるように、サイズ、グリコシル

化の状態、および他のパラメータによって変動しうる。「半減期」のさらなる説明が、Pharmaceutical Biotechnology (1997年、DFAクロメルン(Crommelin)およびRDシンデラー(Sindelar)編、ハーウッド・パブリッシャーズ(Harwood Publishers)、Amsterdam、101-120頁)に存在する。

#### 【0039】

本明細書で使用される「糖コンジュゲーション」という語は、ポリペプチド、例えば、本発明のG-CSFペプチドのアミノ酸またはグリコシル残基への修飾糖種の酵素的に媒介されるコンジュゲーションを指す。「糖コンジュゲーション」の亜属が「糖PEG化」であり、ここでは修飾糖の修飾基はポリ(エチレングリコール)、アルキル誘導体(例えば、m-PEG)、またはその反応誘導体(例えば、H<sub>2</sub>N-PEG、HOOC-PEG)である。

10

#### 【0040】

「大規模」および「工業規模」という語は置換可能に使用され、少なくとも約250mg、好ましくは、少なくとも約500mg、かつより好ましくは、少なくとも約1グラムの糖コンジュゲートを単一反応サイクルの終了時にもたらす反応サイクルを指す。

#### 【0041】

本明細書で使用される「グリコシル連結基」という語は、修飾基(例えば、PEG部分、治療的部分、生体分子)が共有結合されるグリコシル残基を指し、グリコシル連結基は修飾基をコンジュゲートの残りの部分に結合させる。本発明の方法において、「グリコシル連結基」は、グリコシル化または未グリコシル化ペプチドに共有結合され、それによって、薬剤をペプチド上のアミノ酸および/またはグリコシル残基に連結させる。「グリコシル連結基」は一般に「修飾糖」のペプチドのアミノ酸および/またはグリコシル残基との酵素結合による「修飾糖」由来である。グリコシル連結基は、修飾基-修飾糖カセット形成(例えば、酸化 シッフ塩基形成 還元)中に分解されるサッカリド由来構造でありうるし、またはグリコシル連結基が無傷でありうる。「無傷グリコシル連結基」は、修飾基およびコンジュゲートの残りの部分に連結するサッカリドモノマーが分解されず、例えば、メタ過ヨウ素酸ナトリウムによって酸化されないグリコシル部分由来の連結基を指す。本発明の「無傷グリコシル連結基」は、グリコシル単位の添加または親サッカリド構造からの1つもしくはそれ以上のグリコシルの除去による天然起源オリゴ糖由来でありうる。

20

30

#### 【0042】

本明細書で使用される「標的部分」という語は、体内の特定の組織または部位に選択的に局在する種を指す。局在は、分子決定因子の特異的認識、標的剤またはコンジュゲートの分子サイズ、イオン相互作用、疎水性相互作用などによって媒介される。特定の組織または部位に薬剤を標的する他の機序は当業者に周知である。代表的な標的部分としては、抗体、抗体断片、トランスフェリン、HS-糖タンパク質、凝固因子、血清タンパク質、糖タンパク質、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、EPOなどが挙げられる。

#### 【0043】

本明細書で使用される「治療的部分」は、抗生物質、抗炎症剤、抗腫瘍剤、細胞毒素、および放射性医薬品を含むが、これらに限定されない治療に有用な薬剤を意味する。「治療的部分」としては、生物活性剤のプロドラッグ、2つ以上の治療的部分が担体、例えば、多価薬剤に結合されている構成物が挙げられる。治療的部分としては、タンパク質、およびタンパク質を含む構成物も挙げられる。代表的なタンパク質としては、顆粒球コロニー刺激因子(GCSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GMCSF)、インターフェロン(例えば、インターフェロン- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )、インターロイキン(例えば、インターロイキンII)、血清タンパク質(例えば、第VII因子、第VIIa因子、第VII因子、第IX因子、および第X因子)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、および黄体形成ホルモン(LH)、および抗体融合タンパク質(例えば、腫瘍壊死因子受容体(TNFR)/Fcドメイン融合タンパク質)

40

50

）が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用される「医薬的に許容される担体」としては、コンジュゲートと組合せると、コンジュゲートの活性を保持し、対象の免疫系と非反応性である材料が挙げられる。例としては、リン酸緩衝食塩水、水、油／水エマルジョンなどのエマルジョン、およびさまざまな種類の湿潤剤などの標準的な医薬担体のいずれかが挙げられるが、これらに限定されない。他の担体としては、滅菌溶液、被覆錠剤およびカプセルを含む錠剤も挙げられる。一般的にかかる担体は、でんぷん、牛乳、糖、特定の種類の粘土、ゼラチン、ステアリン酸、またはその塩、ステアリン酸マグネシウムまたはカルシウム、タルク、植物性脂肪または油、ゴム、グリコールなどの賦形剤、または他の既知の賦形剤を含有する。かかる担体は、風味および着色添加剤、または他の成分をも含む。かかる担体を含んで成る組成物は、公知の従来の方法によって形成される。

10

【 0 0 4 5 】

本明細書で使用される「投与するステップ」は、対象に対する経口投与、坐剤、局所接触、静脈内、腹腔内、筋内、病巣内、鼻腔内として投与、もしくは皮下投与、または持続放出デバイス、例えば、ミニ浸透ポンプの移植を意味する。投与は、非経口、および経粘膜（例えば、経口、鼻、膣、直腸、または経皮）を含むすべての経路による。非経口投与としては、例えば、静脈内、筋内、動脈内、皮内、皮下、腹腔内、脳室内、および頭蓋内が挙げられる。さらに、注射が腫瘍を治療し、例えば、アポトーシスを誘発する場合、投与は腫瘍へ直接、かつ／または腫瘍周囲の組織へ行うことができる。送達の他の様態としては、リポソーム製剤の使用、静脈内注入、経皮パッチ等が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【 0 0 4 6 】

「緩和すること」または「緩和する」という語は、患者の身体的または精神的健康における症状の軽減、寛解、または減少、または改善など客観的または主観的パラメータを含む病状または状態の治療における奏功の徴候を指す。症状の緩和は、身体検査および／または精神鑑定の結果を含む、客観的または主観的パラメータに基づきうる。

【 0 0 4 7 】

「治療 ( t h e r a p y ) 」という語は、疾患にかかりやすいが、未だ疾患の症状を経験または示していない動物における発生からの疾患または状態の予防（予防的治療）、疾患の抑制（その発症の遅滞または停止）、疾患の症状または副作用からの軽減を提供するステップ（緩和治療を含む）、および疾患の軽減（疾患の逆行をもたらす）を含む疾患または状態の「治療 ( t r e a t i n g ) 」または「治療 ( t r e a t m e n t ) 」を指す。

30

【 0 0 4 8 】

「有効量」もしくは「に有効な量」または「治療に有効な量」あるいは文法的に同等の用語は、疾患を治療するために動物に投与されると、その疾患の治療をもたらすのに十分である量意味する。

【 0 0 4 9 】

「単離」という語は、材料を生成するために使用される成分が実質的または基本的でない材料を指す。本発明のペプチドコンジュゲートについて、「単離」という語は、通常はペプチドコンジュゲートを調製するために使用される混合物中に材料を伴う成分が実質的または基本的でない材料を指す。「単離」および「純粋」は同じ意味で使用される。一般的に、本発明の単離ペプチドコンジュゲートは、好ましくは範囲で表される純度のレベルを有する。ペプチドコンジュゲートの純度の範囲の下端は約 6 0 %、約 7 0 %、または約 8 0 % であり、純度の範囲の上端は約 7 0 %、約 8 0 %、約 9 0 %、もしくは約 9 0 % 超である。

40

【 0 0 5 0 】

ペプチドコンジュゲートが約 9 0 % 超の純度である場合、それらの純度は好ましくは範囲で表される。純度の範囲の下端は約 9 0 %、約 9 2 %、約 9 4 %、約 9 6 %、または約

50

98%である。純度の範囲の上端は約92%、約94%、約96%、約98%、または約100%の純度である。

【0051】

純度は当技術分野で承認されている分析方法（例えば、銀染色ゲル上でのバンド強度、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、HPLC、または同様の手段）によって測定される。

【0052】

本明細書で使用される「集団の基本的に各々のメンバー」により、ペプチドに添加される選択された割合の修飾糖がペプチド上の多数の同一の受容体部位に添加される本発明のペプチドコンジュゲートの集団の特徴が記載される。「集団の基本的に各々のメンバー」は、修飾糖にコンジュゲートされたペプチド上の部位の「均質性」を示し、少なくとも約80%、好ましくは、少なくとも約90%、かつより好ましくは、少なくとも約95%同種である本発明のコンジュゲートを指す。

10

【0053】

「均質性」は、修飾糖がコンジュゲートされている受容体部分の集団にわたる構造上の一致を指す。したがって、各々の修飾部分が、すべての他の修飾糖がコンジュゲートされている受容体部位と同じ構造を有する受容体部位にコンジュゲートされている本発明のペプチドコンジュゲートにおいて、ペプチドコンジュゲートは約100%同種であると考えられている。均質性は一般的に範囲で表される。ペプチドコンジュゲートの均質性の範囲の下端は約60%、約70%、または約80%であり、純度の範囲の上端は約70%、約80%、約90%、もしくは約90%超である。

20

【0054】

ペプチドコンジュゲートは約90%以上同種であり、その均質性も好ましくは範囲で表される。均質性の範囲の下端は約90%、約92%、約94%、約96%、または約98%である。純度の範囲の上端は約92%、約94%、約96%、約98%、または約100%の均質性である。ペプチドコンジュゲートの純度は、一般的に、当業者に周知の1つもしくはそれ以上の方法、例えば、液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS)、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)、キャピラリー電気泳動などによって測定される。

【0055】

「実質的に均一の糖型」または「実質的に均一のグリコシル化パターン」は、糖ペプチド種を参照すると、目的のグリコシルトランスフェラーゼ（例えば、フコシルトランスフェラーゼ）によってグリコシル化される受容体部分の割合を指す。例えば、1,2フコシルトランスフェラーゼの場合、実質的にGalベータ1,4-GlcNAc-Rおよびそのシアリル化類似体の（下記の通り）すべてが本発明のペプチドコンジュゲートにおいてフコシル化されている場合は、実質的に均一のフコシル化パターンが存在する。本明細書に記載のフコシル化構造において、Fuc-GlcNAcリンケージは一般に1,6または1,3であり、1,6が一般に好ましい。出発原料がグリコシル化受容体部分（例えば、フコシル化Gal1,4-GlcNAc-R部分）を含有しうることを当業者によって理解されるであろう。したがって、計算されたグリコシル化率は、本発明の方法によってグリコシル化される受容体部分、および出発原料においてすでにグリコシル化された受容体部分を含む。

30

40

【0056】

「実質的に均一の」の上記定義における「実質的に」という語は一般に、少なくとも約40%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、またはより好ましくは少なくとも約90%、かつさらにより好ましくは少なくとも約95%の特定のグリコシルトランスフェラーゼの受容体部分がグリコシル化されていることを意味する。

【0057】

置換基が従来の化学式によって指定され、左から右へ書かれている場合、それらは同等に化学的に同一の置換を包含するが、これは構造を右から左へ書くことに由来し、例えば、-CH<sub>2</sub>O-は、-OCH<sub>2</sub>-も開示することが意図されている。

50

## 【 0 0 5 8 】

「アルキル」という語は、単独で、または別の置換の一部として、特に明記しない限り、直鎖もしくは分岐鎖、または環状炭化水素ラジカル、またはその組合せを意味するが、これは完全に飽和され、モノまたはポリ不飽和されうるとともに、示された炭素原子の数（すなわち、 $C_1 - C_{10}$  は 1 ~ 10 個の炭素を意味する）を有する、二または多価ラジカルを含みうる。飽和炭化水素ラジカルの例としては、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*t*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、シクロヘキシル、（シクロヘキシル）メチル、シクロプロピルメチル、例えば、*n*-ペンチル、*n*-ヘキシル、*n*-ヘプチル、*n*-オクチルなどのホモログおよび異性体が挙げられるが、これらに限定されない。非飽和アルキル基は、1 つもしくはそれ以上の二重結合または三重結合を有するものである。非飽和アルキル基の例としては、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-（ブタジエニル）、2, 4-ペンタジエニル、3-（1, 4-ペンタジエニル）、エチニル、1-および3-プロピニル、3-ブチニル、および高いホモログと異性体が挙げられるが、これらに限定されない。「アルキル」という語は、特に言及されていない限り、「ヘテロアルキル」など、以下で詳細に定義されるアルキルの誘導体を含むことも意味される。炭化水素基に限定されるアルキル基は「ホモアルキル」と呼ばれる。

10

## 【 0 0 5 9 】

「アルキレン」という語は、単独で、または別の置換の一部として、限定されることなく、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$  によって例示された通り、アルカン由来の二価ラジカルを意味し、さらに「ヘテロアルキレン」としての下記の基を含む。一般的に、アルキル（またはアルキレン）基は 1 ~ 24 個の炭素原子を有し、10 個以下の炭素原子を有する基が本発明において好ましい。「低級アルキル」または「低級アルキレン」は短鎖アルキルまたはアルキレン基であり、一般に 8 個以下の炭素原子を有する。

20

## 【 0 0 6 0 】

「アルコキシ」、「アルキルアミノ」、および「アルキルチオ」（またはチオアルコキシ）という語はその従来の意味で使用され、それぞれ、酸素原子、アミノ基、またはイオウ原子によって分子の残りの部分に結合したアルキル基を指す。

## 【 0 0 6 1 】

「ヘテロアルキル」という語は、単独で、または別の語と組合せて、特に明記しない限り、安定した直鎖もしくは分岐鎖、または環状炭化水素ラジカル、または、明記された数の炭素原子、および O、N、Si、および S から成る基から選択される少なくとも 1 つのヘテロ原子から成るその組合せを意味し、ここで窒素およびイオウ原子は、場合により、酸化され、かつ窒素ヘテロ原子は、場合により、四級化されうる。ヘテロ原子 O、N および S および Si は、ヘテロアルキル基の内部位置、またはアルキル基が分子の残りの部分に結合した位置に配置されうる。例としては、 $-CH_2-CH_2-O-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$ 、 $-CH_2-S-CH_2-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$ 、 $-CH=CH-O-CH_3$ 、 $-Si(CH_3)_3$ 、 $-CH_2-CH=N-OCCH_3$ 、および  $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$  が挙げられるが、これらに限定されない。2 個までのヘテロ原子、例えば、 $-CH_2-NH-OCH_3$ 、および  $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$  などが連続的でありうる。同様に、「ヘテロアルキレン」という語は、単独で、または別の置換一環として、限定されることなく、 $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$  および  $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$  によって例示されている通り、ヘテロアルキル由来の二価ラジカルを意味する。ヘテロアルキレン基について、ヘテロ原子は鎖末端（例えば、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノなど）のいずれかまたは両方をも占めうる。さらに、アルキレンおよびヘテロアルキレン連結基については、連結基の配向は、連結基の式が書かれている方向によって示されない。例えば、式  $-C(O)_2R'$  は、 $-C(O)_2R'$  および  $-R'C(O)_2-$  を表す。

30

40

50

## 【 0 0 6 2 】

「シクロアルキル」および「ヘテロシクロアルキル」という語は、単独で、または他の語と組合せて、特に明記しない限り、それぞれ、「アルキル」および「ヘテロアルキル」の環状変形を表す。また、ヘテロシクロアルキルについて、ヘテロ原子は、ヘテロサイクルが分子の残りの部分に結合している位置を占めうる。シクロアルキルの例としては、シクロペンチル、シクロヘキシル、1 - シクロヘキセニル、3 - シクロヘキセニル、シクロヘプチルなどが挙げられるが、これらに限定されない。ヘテロシクロアルキルの例としては、1 - ( 1 , 2 , 5 , 6 - テトラヒドロピリジル )、1 - ピペリジニル、2 - ピペリジニル、3 - ピペリジニル、4 - モルホリニル、3 - モルホリニル、テトラヒドロフラン - 2 - イル、テトラヒドロフラン - 3 - イル、テトラヒドロチエン - 2 - イル、テトラヒドロチエン - 3 - イル、1 - ピペラジニル、2 - ピペラジニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

10

## 【 0 0 6 3 】

「ハロ」または「ハロゲン」という語は、単独で、または別の置換の一部として、特に明記しない限り、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素原子を意味する。また、「ハロアルキル」などの語は、モノハロアルキルおよびポリハロアルキルを含むことが意味される。例えば、「ハロ ( C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> ) アルキル」という語は、トリフルオロメチル、2, 2, 2 - トリフルオロエチル、4 - クロロブチル、3 - ブロモプロピルなどを含むが、これらに限定されないことが意味される。

## 【 0 0 6 4 】

20

「アリアル」という語は、特に明記しない限り、融合され、または共有結合されている単一環または多重環（好ましくは、1 ~ 3 個の環）でありうるポリ非飽和、芳香族、置換を意味する。「ヘテロアリアル」という語は、N、O、およびSから選択される1 ~ 4 個のヘテロ原子を含有するアリアル基（または環）を指し、ここで窒素およびイオウ原子は場合により酸化され、窒素原子は場合により四級化される。ヘテロアリアル基は、ヘテロ原子により分子の残りの部分に結合されうる。アリアルおよびヘテロアリアル基の非限定的例としては、フェニル、1 - ナフチル、2 - ナフチル、4 - ビフェニル、1 - ピロリル、2 - ピロリル、3 - ピロリル、3 - ピラゾリル、2 - イミダゾリル、4 - イミダゾリル、ピラジニル、2 - オキサゾリル、4 - オキサゾリル、2 - フェニル - 4 - オキサゾリル、5 - オキサゾリル、3 - イソオキサゾリル、4 - イソオキサゾリル、5 - イソオキサゾリル、2 - チアゾリル、4 - チアゾリル、5 - チアゾリル、2 - フリル、3 - フリル、2 - チエニル、3 - チエニル、2 - プリジル、3 - プリジル、4 - プリジル、2 - プリミジル、4 - プリミジル、5 - ベンゾチアゾリル、プリニル、2 - ベンズイミダゾリル、5 - インドリル、1 - イソキノリル、5 - イソキノリル、2 - キノキサリニル、5 - キノキサリニル、3 - キノリル、テトラゾリル、ベンゾ [ b ] フラニル、ベンゾ [ b ] チエニル、2, 3 - ジヒドロベンゾ [ 1, 4 ] ジオキシシ - 6 - イル、ベンゾ [ 1, 3 ] ジオキソール - 5 - イル、および6 - キノリルが挙げられる。上記アリアルおよびヘテロアリアル環系の各々の置換基は、下記の許容される置換の基から選択される。

30

## 【 0 0 6 5 】

簡潔さのために、「アリアル」という語は、他の語（例えば、アリアルオキシ、アリアルチオキシ、アリアルアルキル）と組合せて使用されると、上記のアリアルとヘテロアリアル環の両方を含む。したがって、「アリアルアルキル」という語は、炭素原子（例えば、メチレン基）が、例えば、酸素原子（例えば、フェノキシメチル、2 - プリジルオキシメチル、3 - ( 1 - ナフチルオキシ ) プロピルなど）によって置換されているアルキル基を含むアルキル基（例えば、ベンジル、フェネチル、プリジルメチルなど）にアリアル基が結合されているラジカルを含むことが意味される。

40

## 【 0 0 6 6 】

上記の語の各々（例えば、「アルキル」、「ヘテロアルキル」、「アリアル」、および「ヘテロアリアル」）は、指示ラジカルの置換および非置換形態を含むことが意味される。各々の型のラジカルの好ましい置換基は以下に示されている。

50

## 【0067】

アルキルおよびヘテロアルキルラジカル（アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル、およびヘテロシクロアルケニルとしばしば呼ばれる基を含む）の置換基は、一般的に「アルキル基置換基」と呼ばれ、それらは、 $-OR'$ 、 $=O$ 、 $=NR' = N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR'R''C(O)R'$ 、 $-NR'-C(O)NR'R''R'''$ 、 $-NR'R''C(O)_2R'$ 、 $-NR-C(NR'R''R''')=NR'R''R'''$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR'R''R'''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NRSO_2R'$ 、 $-CN$ 、および $-NO_2$ であるが、これらに限定されないものから選択されるさまざまな基の1つもしくはそれ以上でありうるが、数字の範囲はゼロ～ $(2m'+1)$ であり、ここで $m'$ はかかるラジカルにおける炭素原子の総数である。 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 、および $R''''$ は各々好ましくは独立して水素、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、例えば、1-3個のハロゲンで置換されたアリール、置換もしくは非置換アルキル、アルコキシもしくはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を指す。本発明の化合物が2つ以上のR基を含む場合、例えば、R基の各々が独立して、これらの基の2つ以上が存在する場合に各々 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 、および $R''''$ であるように選択される。 $R'$ および $R''$ が同じ窒素原子に結合されている場合、それらは窒素原子と組合され、5-、6-、または7-員環を形成しうる。例えば、 $-NR'R''$ は、1-ピロリジニルおよび4-モルホリニルを含むが、これらに限定されないことが意味される。置換基の上記の議論から、当業者は、「アルキル」という語が、ハロアルキル（例えば、 $-CF_3$ および $-CH_2CF_3$ ）およびアシル（例えば、 $-C(O)CH_3$ 、 $-C(O)CF_3$ 、 $-C(O)CH_2OCH_3$ など）などの水素基以外の基に結合された炭素原子を含む基を含むことが意味されることを理解するであろう。

## 【0068】

アルキルラジカルについて記載された置換基と同様、アリールおよびヘテロアリール基の置換基は一般的に「アリール基置換」と呼ばれる。置換基は、例えば、ハロゲン、 $-OR'$ 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR'R''C(O)R'$ 、 $-NR'-C(O)NR'R''R'''$ 、 $-NR'R''C(O)_2R'$ 、 $-NR-C(NR'R''R''')=NR'R''R'''$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR'R''R'''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NRSO_2R'$ 、 $-CN$ および $-NO_2$ 、 $-R'$ 、 $-N_3$ 、 $-CH(Ph)_2$ 、フルオロ( $C_1-C_4$ )アルコキシ、およびフルオロ( $C_1-C_4$ )アルキルから選択されるが、数字の範囲はゼロ～芳香族系での開放価の総数であり、かつここで $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 、および $R''''$ は好ましくは独立して水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、および置換もしくは非置換ヘテロアリールから選択される。本発明の化合物が2つ以上のR基を含む場合、例えば、R基の各々が独立して、これらの基の2つ以上が存在する場合に各々 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 、および $R''''$ であるように選択される。次のスキームにおいて、記号Xは上記の「R」を表す。

## 【0069】

アリールまたはヘテロアリール環の隣接原子上の置換基の2つが、場合により、式 $-T-C(O)-(CRR')_u-U$  [式中、TおよびUは独立して $-NR-$ 、 $-O-$ 、 $CRR'$ または単一結合であり、uは0～3の整数である]の置換基で置換されうる。あるいは、アリールまたはヘテロアリール環の隣接原子上の置換基の2つが、場合により、式 $-A-(CH_2)_r-B$  [式中、AおよびBは独立して $-CRR'$ 、 $-O-$ 、 $-NR-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NR'$ 、または単一結合



であり、 $r$  は 1 ~ 4 の整数で 4 ある ] の置換基で置換されうる。こうして形成された新しい環の単一結合の 1 つが、場合により、二重結合で置換されうる。あるいは、アリールまたはヘテロアリール環の隣接原子上の置換基の 2 つが、場合により、式  $-(CRR')_z-X-(CRR'R'R')_d-$  [ 式中、 $z$  および  $d$  は独立して 0 ~ 3 の整数であり、かつ  $X$  は  $-O-$ 、 $-NR'-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、または  $-S(O)_2NR'-$  である ] の置換基で置換されうる。置換基  $R$ 、 $R'$ 、 $R''$ 、および  $R'''$  は、好ましくは、独立して水素または置換もしくは非置換 ( $C_1 - C_6$ ) アルキルから選択される。

#### 【0070】

本明細書で使用される「ヘテロ原子」という語は、酸素 (O)、窒素 (N)、イオウ (S)、およびケイ素 (Si) を含むことが意味される。

10

#### 【0071】

はじめに

本発明は、 $G-CSF$  でのグリカン構造の修飾のための方法を包含する。 $G-CSF$  は、活性化 T 細胞、マクロファージ、内皮細胞、および間質線維芽細胞によって生成されるサイトカインとして当業界で公知である。 $G-CSF$  は主に骨髄で作用し、炎症性白血球の産生を増大させ、さらに内分泌性ホルモンとして作用し、炎症性機能中に消費される好中球の補充を開始させる。 $G-CSF$  には化学療法後の骨髄置換における臨床用途もある。

#### 【0072】

20

本発明は、顆粒球コロニー刺激因子 ( $G-CSF$ ) のコンジュゲートを提供する。本発明は、顆粒球コロニー刺激活性を有するグリコシル化および未グリコシル化ペプチドのコンジュゲートを提供する。コンジュゲートは、治療的部分、診断的部分、標的部分などなどのさまざまな種によるコンジュゲーションによって追加的に修飾されうる。

#### 【0073】

本発明はさらに、 $G-CSF$  の再構築および / または修飾の方法を含む。 $G-CSF$  は、多数の疾患の治療における有益な手段であるが、上記の通り、その臨床的有効性はその比較的不良な薬物動態によって阻まれている。

#### 【0074】

代表的な実施形態において、本発明の  $G-CSF$  ペプチドが、特定の種類の放射線療法、化学療法、および骨髄移植を受ける癌患者における感染を予防する目的のために患者に投与され、原因にかかわらず、重篤な慢性または相対的白血球減少症の治療のために末梢血前駆細胞移植における収集のための前駆細胞を動員し、かつ急性骨髄性白血病の治療を支持しうる。また、本発明のポリペプチドコンジュゲートまたは組成物は、AIDS または他の免疫不全疾患および細菌感染の治療に使用されうる。

30

#### 【0075】

$G-CSF$  はクローン化され、配列決定されている。代表的な実施形態において、 $G-CSF$  は、配列番号 1 または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する。当業者は、本発明が本明細書に示された配列に限定されないだけでなく、本明細書での上記の通り、 $G-CSF$  の変異形を含むことも容易に十分に理解するであろう。

40

#### 【0076】

したがって、本発明はさらに、当業界で公知の  $G-CSF$  変異形を包含する。一例として、ただし決して本発明を限定するためではなく、 $G-CSF$  変異形は米国特許第 6, 166, 183 号明細書に記載されており、ここでリシン残基の非天然相補体を含んで成り、さらに 1 つもしくは 2 つのポリエチレングリコール分子に連結された  $G-CSF$  が記載されている。また、米国特許第 6, 004, 548 号明細書、同第 5, 580, 755 号明細書、同第 5, 582, 823 号明細書、および同第 5, 676, 941 号明細書では  $G-CSF$  変異形が記載されており、ここでは位置 17、36、42、64、および 74 における 1 つもしくはそれ以上のシステイン残基がアラニン、または代わりとしてセリンによって置換されている。米国特許第 5, 416, 195 号明細書は、位置 17 でシステ

50

イン、位置 27 でアスパラギン酸、および位置 65 および 66 でセリンが、それぞれ、セリン、セリン、プロリン、およびプロリンで置換されている G - C S F 分子を記載している。他の変異形は当業界で公知であり、例えば、米国特許第 5,399,345 号明細書に記載されている。さらなる変異形は配列番号 3 - 11 から選択されるアミノ酸を有する。

#### 【0077】

本発明の修飾 G - C S F の発現および活性は、当業界で公知の方法を使用し、かつ、例えば、米国特許第 4,810,643 号明細書に記載されている通り評価されうる。一例として、活性は、放射性標識チミジン取込みアッセイを使用して測定されうる。手短に言えば、健康なドナーからのヒト骨髄を F i c o l l - H y p a q u e ( 1 . 0 7 7 g / m L 、ファルマシア ( P h a r m a c i a ) 、 P i s c a t a w a y 、 ニ ュ ー ジ ャ ー 州 ( N J ) ) による密度カットにかけ、低密度細胞を、10%ウシ胎仔血清、グルタミン、および抗生物質を含有するイスコーブ ( I s c o v e ) 培地 (ジブコ ( G I B C O 、 L a J o l l a 、 カリフォルニア州 ( C A ) ) 中に懸濁する。約  $2 \times 10^4$  ヒト骨髄細胞を対照培地または本発明の G - C S F のいずれかで 96 ウェル平底プレートにおいて約 37 下、大気中 5%  $\text{CO}_2$  で約 2 日間インキュベートする。次いで、培養物を約 4 時間、0.5  $\mu\text{Ci}$  / ウェルの  $^3\text{H}$  - チミジン ( ニュー・イングランド・ヌークレア ( N e w E n g l a n d N u c l e a r ) 、 B o s t o n 、 マサチューセッツ州 ( M a s s . ) ) でパルスし、例えば、ベンチュア ( V e n t u a ) ら ( 1 9 8 3 年、B l o o d 61:781 頁 ) に記載されている通り取込みを測定する。対照化合物で処理した骨髄細胞と比較したヒト骨髄細胞への  $^3\text{H}$  - チミジン取込みの増大が、活性および有望な G - C S F を示す。

#### 【0078】

上記の通り、本発明のコンジュゲートは、修飾糖のグリコシル化または未グリコシル化 G - C S F ペプチドとの酵素結合によって形成される。修飾糖は、G - C S F ペプチドと糖上の修飾基との間に挿入されると、本明細書では例えば、「無傷グリコシル連結基」と呼ばれうるものになる。グリコシルトランスフェラーゼなど酵素の優れた選択性を使用することにより、本方法は、1 つもしくはそれ以上の特定の位置で所望の基を有するペプチドを提供する。したがって、本発明によれば、修飾糖が直接、G - C S F ペプチド鎖上の選択位置に結合され、あるいは、修飾糖は糖ペプチドの炭水化物部分へ付加される。修飾糖が糖ペプチド炭水化物、および G - C S F ペプチド骨格のアミノ酸残基に直接結合されているペプチドも本発明の範囲内である。

#### 【0079】

既知の化学的および酵素的ペプチド精緻化法とは対照的に、本発明の方法は、実質的に同種の誘導体化パターンを有するペプチドおよび糖ペプチドをアSEMBL することを可能にし、本発明において使用される酵素は一般に特定のアミノ酸残基または G - C S F ペプチドのアミノ酸残基の組合せに対して選択的である。この方法は、修飾ペプチドおよび糖ペプチドの大規模製造にも実用的である。したがって、本発明の方法は、予め選択された均一の誘導体化パターンを有する糖ペプチドの大規模調製のための実用的な手段を提供する。この方法は、詳しくは、細胞培養細胞 (例えば、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、真菌細胞、酵母細胞、または原核細胞) またはトランスジェニックの植物もしくは動物における製造中に不完全にグリコシル化される糖ペプチドを含むがこれに限定されない治療的ペプチドの修飾に適切である。

#### 【0080】

本発明は、例えば、免疫もしくは細網内皮系 ( R E S ) によるクリアランス率の削減、または取込み率の削減による治療的半減期が増大されたグリコシル化および未グリコシル化 G - C S F ペプチドのコンジュゲートも提供する。さらに、本発明の方法は、ペプチド上の抗原決定基をマスキングするための手段を提供し、したがって、ペプチドに対する宿主免疫反応を削減または除去する。標的剤の選択的結合を使用し、特定の標的剤に特異的である特定の組織または細胞表面受容体にペプチドを標的することもできる。

## 【 0 0 8 1 】

## コンジュゲート

第 1 の態様において、本発明は、選択修飾基と G - C S F ペプチドとの間にコンジュゲートを提供する。

## 【 0 0 8 2 】

ペプチドと修飾部分との連結は、ペプチドと選択部分との間に挿入されたグリコシル連結基を含む。本明細書で論じるように、選択修飾部分は基本的にサッカリド単位に結合されうる種であり、結果として、修飾糖をペプチドへ付加する適切なトランスフェラーゼ酵素、またはそれに結合されたグリコシル基によって認識される「修飾糖」がもたらされる。修飾糖のサッカリド成分は、ペプチドと選択部分との間に挿入されると、「グリコシル連結基」、例えば、「無傷グリコシル連結基」になる。グリコシル連結基は、修飾基による修飾後、修飾糖をペプチドのアミノ酸またはグリコシル残基に添加する酵素の基質である単糖またはオリゴ糖から形成される。

10

## 【 0 0 8 3 】

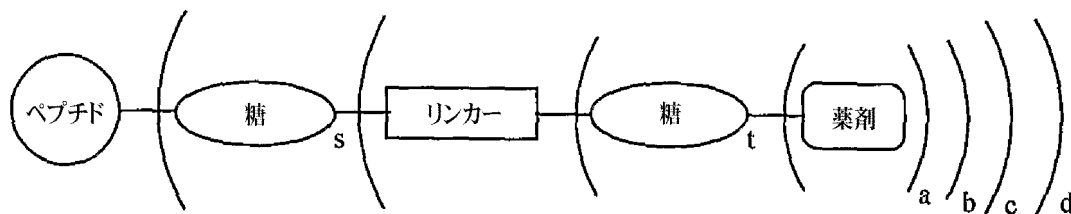
グリコシル連結基は、修飾基の添加前またはその最中に分解的に修飾されるサッカリド部分であり、またはこれを含みうる。例えば、グリコシル連結基は、例えば、メタ過ヨウ素酸の作用によって、対応するアルデヒドへの無傷サッカリドの酸化的分解反応によって生成され、その後に適切なアミンでシッフ塩基に変換され、これが次いで、対応するアミンに還元されるサッカリド残基由来でありうる。

## 【 0 0 8 4 】

本発明のコンジュゲートは一般に一般構造

20

## 【 化 4 】



[ 式中、記号 a、b、c、d、および s は正の、ゼロ以外の整数を表し、t は 0 または正の整数のいずれかである。「薬剤」は治療薬、生物活性薬、検出可能な標識、水溶性部分 (例えば、PEG、m-PEG、PPG、および m-PPG) または同様のものである。「薬剤」はペプチド、例えば、酵素、抗体、抗原等でありうる。リンカーは下記の多様な連結基でありうる。あるいは、リンカーは単一結合または「ゼロ順位リンカー」でありうる ] に対応する。

30

## 【 0 0 8 5 】

代表的な実施形態において、選択修飾基は水溶性ポリマー、例えば、m-PEG である。水溶性ポリマーはグリコシル連結基によってペプチドに共有結合されている。グリコシル連結基はペプチドのアミノ酸残基またはグリコシル残基に共有結合されている。本発明は、アミノ酸残基およびグリコシル残基がグリコシル連結基で修飾されているコンジュゲートをも提供する。

40

## 【 0 0 8 6 】

代表的な水溶性ポリマーはポリ (エチレングリコール)、例えば、メトキシポリ (エチレングリコール) である。本発明で使用するポリ (エチレングリコール) は、特定の形態または分子量範囲に制限されていない。非分岐ポリ (エチレングリコール) 分子については、分子量は、好ましくは、500 ~ 100,000 である。2000 - 60,000 の分子量が好ましくは使用され、好ましくは、約 5,000 ~ 約 30,000 である。

## 【 0 0 8 7 】

別の実施形態において、ポリ (エチレングリコール) は、付加された 2 つ以上の PEG 部分を有する分岐 PEG である。分岐 PEG の例は、米国特許第 5,932,462 号明

50

細書、米国特許第5,342,940号明細書、米国特許第5,643,575号明細書、米国特許第5,919,455号明細書、米国特許第6,113,906号明細書、米国特許第5,183,660号明細書、国際公開第02/09766号パンフレット、コデラ(Kodera)Y.、Bioconjugate Chemistry 5:283-288頁(1994年)、およびヤマサキ(Yamasaki)ら、Agric. Biol. Chem.、52:2125-2127頁、1998年に記載されている。好ましい実施形態において、分岐PEGの各々のポリ(エチレングリコール)の分子量は、40,000ダルトン以下である。

#### 【0088】

酵素的に添加されるグリコシル連結基により形成されるコンジュゲートを提供するステップに加えて、本発明は、その置換パターンがきわめて同種であるコンジュゲートを提供する。本発明の方法の使用により、本発明のコンジュゲートの集団にわたって修飾糖部分の基本的にすべてが構造的に同一のアミノ酸またはグリコシル残基に結合されるペプチドコンジュゲートを形成することが可能である。したがって、第2の態様において、本発明は、グリコシル連結基、例えば、無傷グリコシル連結基によりペプチドに共有結合される水溶性ポリマー部分の集団を有するペプチドコンジュゲートを提供する。本発明の好ましいコンジュゲートにおいて、基本的に集団の各々のメンバーはグリコシル連結基によってペプチドのグリコシル残基に結合され、グリコシル連結基が結合されるペプチドの各々のグリコシル残基は同じ構造を有する。

#### 【0089】

グリコシル連結基によりそれに共有結合された水溶性ポリマー部分の集団を有するペプチドコンジュゲートも提供される。好ましい実施形態において、水溶性ポリマー部分の集団の基本的にすべてのメンバーは、グリコシル連結基によってペプチドのアミノ酸残基に結合され、それに結合されたグリコシル連結基を有するアミノ酸残基は同じ構造を有する。

#### 【0090】

本発明は、ペプチドが治療的部分、診断的部分、標的部分、毒素部分、または同様のものに無傷グリコシル連結基によってコンジュゲートされている上記のものと類似のコンジュゲートをも提供する。上記部分の各々は小分子、非天然ポリマー(例えば、ポリペプチド)または合成ポリマーでありうる。修飾部分がシアル酸に結合されている場合、修飾部分は実質的に非蛍光であることが好ましい。

#### 【0091】

任意の配列を有する基本的にいずれかの顆粒球コロニー刺激因子ペプチドまたは薬剤は、本発明のコンジュゲートのペプチド成分として使用される。顆粒球コロニー刺激因子はクローン化され、配列決定されている。代表的な例において、G-CSFペプチドは配列番号1に示されている配列を有する。すなわち、

#### 【化5】

MTPLGPASSLPQSFLCLKLEQVRKIQGDGAALQEKLCAATYK  
LCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQQLHSG  
FLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEE  
LGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEV  
SYRVLRHLAQP (配列番号:1)

#### 【0092】

別の代表的な例において、G-CSFペプチドは配列番号2に示されている配列を有す

る。すなわち、  
【化 6】

TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA<sub>1</sub>TYKL  
CHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGLF  
LYQG<sub>2</sub>LLQALEGISPELGPTLDTLQLDVAD<sub>3</sub>FATTIWQQMEEL  
GMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVS  
YRVLRHLAQP (配列番号：2)

10

【0093】

別の代表的な例において、G - C S F ペプチドは以下の配列番号 3 - 1 1 に示されている配列を有する。すなわち、

【化 7】

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL VSECA  
TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS QL  
HSGFLFYQG LLQALEGISPELGPTLDTLQLDVAD FATTIWQ  
QMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGV LVASHLQ  
SFLEVSYRVLRHLAQP (配列番号 : 3)

10

MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLGPASSL  
PQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL CATYKLCHPEELVLL  
GHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS QLHSGFLFYQG LLQA  
LEGISPELGPTLDTLQLDVAD FATTIWQQMEELGMAPALQP  
TQGAMPAFASAFQRRAGGV LVASHLQSFLEVSYRVLRHLA  
QP (配列番号 : 4)

20

MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLGPASSL  
PQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL VSECATYKLCHPEEL  
VLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS QLHSGFLFYQG L  
LQALEGISPELGPTLDTLQLDVAD FATTIWQQMEELGMAPA  
LQPTQGAMPAFASAFQRRAGGV LVASHLQSFLEVSYRVLR  
HLAQP (配列番号 : 5)

30

MVTP LGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL CATY  
KLCHPEELVLLGHTLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS QLHS  
GLFLFYQG LLQALEGISPELGPTLDTLQLDVAD FATTIWQQM  
EELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGV LVASHLQSFL  
EVSYRVLRHLAQP (配列番号 : 6)

40

## 【化 8】

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYK  
 LCHPEELVLLGHTLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSLSHSG  
 FLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEE  
 LGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEV  
 SYRVLRHLAQP (配列番号: 7)

10

MVTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATY  
 KLCHPEELVLLGSSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSLSHSG  
 LFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQME  
 ELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLE  
 VSYRVLRHLAQP (配列番号: 8)

20

MQTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATY  
 KLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSLSHS  
 GLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQM  
 EELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFL  
 EVSYRVLRHLAQP (配列番号: 9)

30

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYK  
 LCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSLSHSG  
 FLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEE  
 LGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEV  
 SYRVLRHLAQP (配列番号: 10); および

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYK  
 LCHPEELVLLGSSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSLSHSG  
 FLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEE  
 LGMAPTTTPTQTAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEV  
 SYRVLRHLAQP (配列番号: 11)

40

## 【0094】

本発明は、決して本明細書に記載の配列に限定されない。ペプチドの特性を増加または減少させ、または構造的特徴を変更するために突然変異される他の配列の G - C S F ペプチドの使用が本発明の範囲内である。例えば、本発明において使用される変異 G - C S F ペプチドは、追加の O - グリコシル化部位または他の位置でのかかる部位が供給されるものを含む。さらに、1 つもしくはそれ以上の N - グリコシル化部位を含む変異ペプチドが本発明において使用される。

## 【0095】

好ましくは、G - C S F ペプチドのアミノ末端もカルボキシ末端もポリマー修飾部分で

50

誘導体化されない。

【 0 0 9 6 】

本発明のペプチドは、少なくとも 1 つの O 連結または N 連結グリコシル化部位を含み、これはポリマー修飾部分、例えば、PEG 部分を含むグリコシル残基でグリコシル化される。代表的な実施形態において、PEG は無傷グリコシル連結基によってペプチドに共有結合されている。グリコシル連結基は、ペプチドのアミノ酸残基またはグリコシル残基のいずれかに共有結合されている。あるいは、グリコシル連結基は、糖ペプチドの 1 つもしくはそれ以上のグリコシル単位に結合されている。本発明は、グリコシル連結基がアミノ酸残基およびグリコシル残基に結合されているコンジュゲートをも提供する。

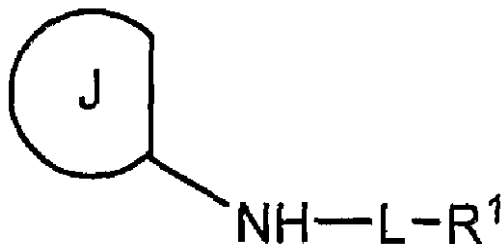
【 0 0 9 7 】

PEG 部分は無傷グリコシルリンカーに直接、または非グリコシルリンカー、例えば、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキルによって結合されている。

【 0 0 9 8 】

代表的な実施形態において、本発明は式

【 化 9 】



[ 式中、J はグリコシル部分（例えば、ヌクレオチド糖）であり、L は結合またはリンカーであり、R¹ は修飾基、例えば、ポリマー修飾部分である ] を有する修飾糖アミンを使用する。代表的な結合は、グリコシル部分での NH₂ 部分と修飾基での相補的反応性の基との間に形成されるものである。例えば、R¹ がカルボン酸部分を含む場合、この部分は活性化され、グリコシル残基での NH₂ 部分と結合され、構造 NH-C(=O)-R¹ を有する結合を与える。J は、好ましくは、ピラノースまたはフラノース構造を開裂する条件、例えば、酸化的条件、例えば、過ヨウ素酸ナトリウムにさらされることによって分解されていない、「無傷」であるグリコシル部分である。

【 0 0 9 9 】

代表的なリンカーとしてはアルキルおよびヘテロアルキル部分が挙げられる。リンカーとしては、連結基、例えば、アシルベースの連結基、例えば、-C(=O)-NH-、-O-C(=O)-NH- などが挙げられる。連結基は、本発明の種の成分間、例えば、グリコシル部分とリンカー（L）との間、またはリンカーと修飾基（R¹）との間に形成された結合である。他の代表的な連結基はエーテル、チオエーテル、およびアミンである。例えば、1 つの実施形態において、リンカーは、グリシン残基などのアミノ酸残基である。グリシンのカルボン酸部分は、グリコシル残基でのアミンとの反応によって対応するアミドへ変換され、グリシンのアミンは修飾基の活性化カルボン酸または炭酸塩との反応によって対応するアミドまたはウレタンへ変換される。

【 0 1 0 0 】

別の代表的なリンカーは PEG 部分、例えば、アミノ酸残基で官能化される PEG 部分である。PEG リンカーは、1 つの PEG 末端でアミノ酸残基によりグリコシル基にコンジュゲートされ、かつ他の PEG 末端により R¹ に結合されている。あるいは、アミノ酸残基は R¹ に結合され、アミノ酸に結合されていない PEG 末端はグリコシル基に結合されている。



NH-L-R<sup>1</sup>の代表的な種は式：

10

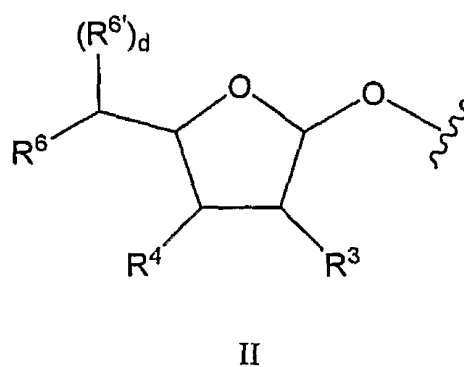
より詳しくは、本発明では、 $\text{NH}-\text{L}-\text{R}^1$ が、 $\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_a\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NHR}^1$ 、 $\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NHR}^1$ 、 $\text{NHC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NHR}^1$ 、 $\text{NH}(\text{CH}_2)_a\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NHR}^1$ 、 $\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_a\text{NHR}^1$ 、 $\text{NHC}(\text{CH}_2)_a\text{NHR}^1$ 、および $\text{NHR}^1$ である化合物が使用される。これらの式において、指数a、b、およびdは、0～20、好ましくは、1～5の整数から独立して選択される。指数cは1～約2500の整数である。

代表的な実施形態において、cは、PEG部分がおよそ1kDa、2kDa、5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa、または80kDaであるように選択される。

次の議論において、本発明は、フラノースおよびピラノースの選択誘導体の使用を参照することにより説明される。当業者は、議論の焦点が説明の明確さであり、かつ記載されている構造および組成物がサッカリド基、修飾サッカリド基、活性化修飾サッカリド基、および修飾サッカリド基のコンジュゲートの属にわたって一般に適用可能であることを認識するであろう。

代表的な実施形態において、本発明は、

I



50

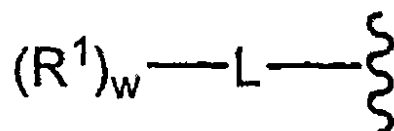
ⅠⅠにおいて、記号  $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、および  $R^{6'}$  は独立して H、置換もしくは非置換アルキル、 $OR^8$ 、 $NHC(O)R^9$  を表す。指数  $d$  は 0 または 1 である。 $R^8$  および  $R^9$  は独立して H、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、シアル酸、またはポリシアル酸から選択される。 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、および  $R^{6'}$  の少なくとも 1 つは、ポリマー修飾部分、例えば、結合または連結基により連結された PEG を含む。代表的な実施形態において、 $R^6$  および  $R^{6'}$  は、それらが結合される炭素といっしょにシアル酸のビルビル側鎖の成分である。さらに代表的な実施形態において、この側鎖はポリマー修飾部分で官能化されている。別の代表的な実施形態において、 $R^6$  および  $R^{6'}$  は、それらが結合される炭素といっしょにシアル酸の側鎖の成分であり、ポリマー修飾部分は  $R^5$  の成分である。

10

【0106】

さらに代表的な実施形態において、ポリマー修飾部分は、一般にヘテロ原子、例えば、窒素により、以下の式

【化11】



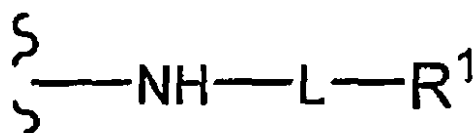
20

[ 式中、 $R^1$  はポリマー部分であり、 $L$  は結合および連結基から選択される。指数  $w$  は、1 - 6、好ましくは、1 - 3、かつより好ましくは、1 - 2 から選択される整数を表す ] に示される通り、リンカー、 $L$  によりコア上で糖コアに結合される。代表的な連結基は、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル部分およびシアル酸を含む。リンカーの代表的成分がアシル部分である。

【0107】

本発明による代表的な化合物は、式ⅠまたはⅠⅠによる構造を有し、ここで  $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、または  $R^{6'}$  の少なくとも 1 つは式

【化12】



30

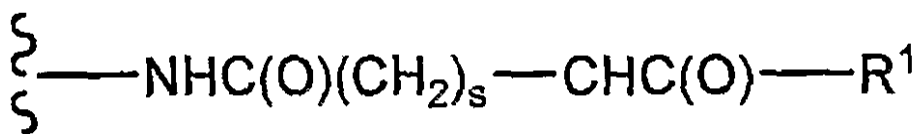
を有する。

【0108】

本実施形態に記載の別の実施例において、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、または  $R^{6'}$  の少なくとも 1 つは式

40

【化13】



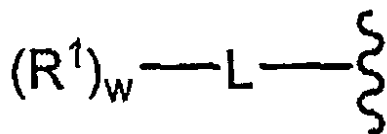
[ 式中、 $s$  は 0 ~ 20 の整数であり、 $R^1$  は線状ポリマー修飾部分である ] を有する。

50

## 【 0 1 0 9 】

代表的な実施形態において、ポリマー修飾部分 - リンカー構成物は、中心部分に結合した2つもしくはそれ以上のポリマー鎖を含む分岐構造である。本実施形態において、構成物は式

## 【 化 1 4 】



10

[ 式中、 $R^1$  および  $L$  は上記の通りであり、 $w$  が 2 ~ 6、好ましくは、2 ~ 4、かつより好ましくは、2 ~ 3 の整数である ] を有する。

## 【 0 1 1 0 】

$L$  が結合である場合、これは  $R^1$  の前駆体上の反応官能基とサッカリールコア上の相補的反応性の反応官能基との間に形成される。 $L$  がゼロ順位リンカーである場合、 $L$  の前駆体は  $R^1$  前駆体との反応前にグリコシル部分上の適所にありうる。あるいは、 $R^1$  および  $L$  の前駆体は、その後、グリコシル部分に結合される前もって作られたカセットへ組み込まれる。本明細書に記載されているように、適切な反応官能基を有する前駆体の選択および調製は当業者の能力の範囲内である。さらに、前駆体の結合は、当技術分野で十分に理解されている化学によって進行する。

20

## 【 0 1 1 1 】

代表的な実施形態において、 $L$  は、アミノ酸、または、ポリマー修飾部分が置換アルキルリンカーにより結合されている修飾糖を提供する小さなペプチド（例えば、1 - 4 アミノ酸残基）から形成される連結基である。代表的なリンカーとしては、グリシン、リシン、セリン、およびシステインが挙げられる。PEG 部分は、アミドまたはウレタン結合によりリンカーのアミン部分に結合されうる。PEG は、それぞれ、チオエーテルまたはエーテル結合によりシステインおよびセリンのイオウまたは酸素原子に連結される。

## 【 0 1 1 2 】

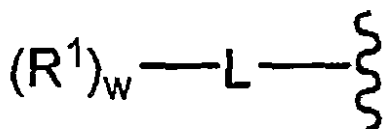
代表的な実施形態において、 $R^5$  はポリマー修飾部分を含む。別の代表的な実施形態において、 $R^5$  は、ポリマー修飾部分、および修飾部分を分子の残りの部分に結合するリンカー、 $L$  を含む。上記の通り、 $L$  は線状または分岐構造でありうる。同様に、ポリマー修飾部分は分岐または線状でありうる。

30

## 【 0 1 1 3 】

代表的な実施形態において、

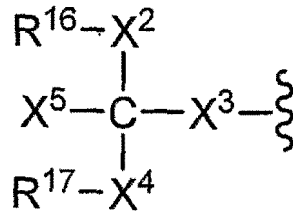
## 【 化 1 5 】



40

は次式

【化 1 6】

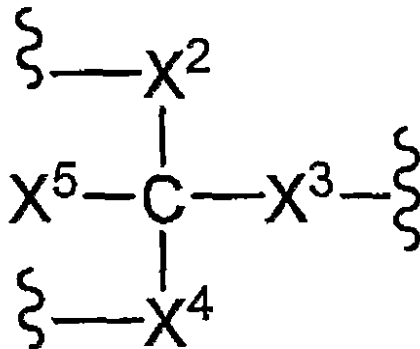


(III)

〔式中、部分

10

【化 1 7】



20

はリンカー腕、L、であり、 $R^{16}$  および  $R^{17}$  は  $R^1$  である。 $R^{16}$  および  $R^{17}$  は独立してポリマー修飾部分から選択される。Cは炭素である。 $X^5$  は、好ましくは、非反応基（例えば、H、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル）であり、ポリマー腕でありうる。 $X^2$  および  $X^4$  は、好ましくは、同じまたは異なりうる、生理的条件下に非反応であるリンケージ断片である。代表的なリンカーは、芳香族もエステル部分も含まない。あるいは、これらのリンケージは、生理的に関連性の条件下に分解するようにデザインされている1つもしくはそれ以上の部分、例えば、エステル、ジスフィルド等を含みうる。 $X^2$  および  $X^4$  はポリマー腕  $R^{16}$  および  $R^{17}$  をCに結合させる。 $X^2$ 、 $X^3$ 、および  $X^4$  の代表的なリンケージ断片は独立して選択され、S、SC(O)NH、HNC(O)S、SC(O)O、O、NH、NHC(O)、(O)CNH、およびNHC(O)O、およびOC(O)NH、CH<sub>2</sub>S、CH<sub>2</sub>O、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S、(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>、O、(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>、Sまたは(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>、Y'-PEGを含み、ここでY'はS、NH、NHC(O)、C(O)NH、NHC(O)O、OC(O)NH、またはOであり、oは1～50の整数である。代表的な実施形態において、リンケージ断片  $X^2$  および  $X^4$  は異なるリンケージ断片である〕による構造を有する。

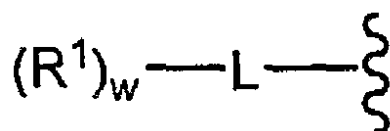
30

【0114】

代表的な実施形態において、

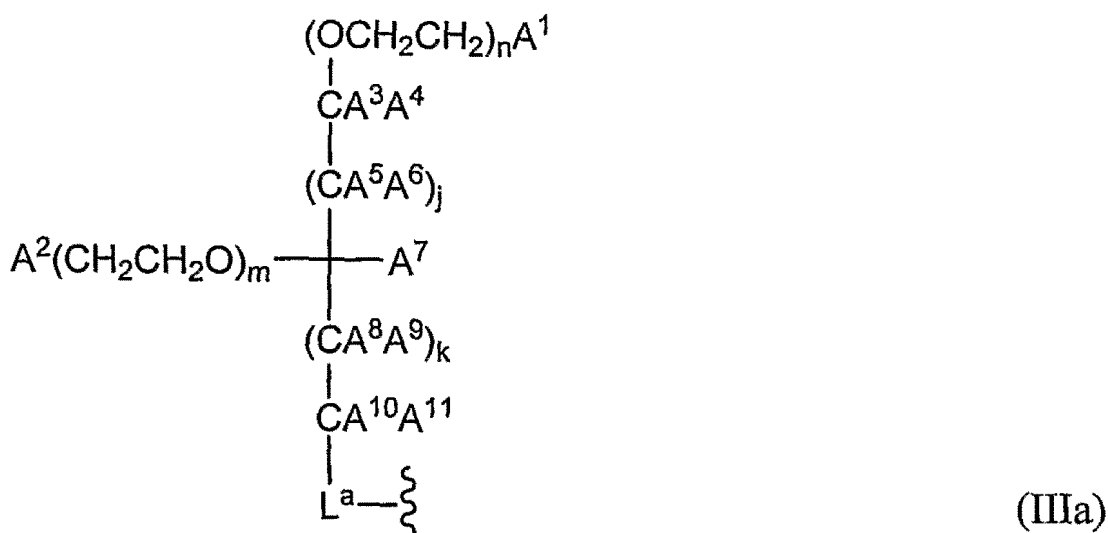
40

【化 1 8】



は次式

【化 1 9】



10

〔指数  $m$  および  $n$  は、独立して  $0 \sim 5000$  から選択される整数である。  $\text{A}^1$ 、 $\text{A}^2$ 、 $\text{A}^3$ 、 $\text{A}^4$ 、 $\text{A}^5$ 、 $\text{A}^6$ 、 $\text{A}^7$ 、 $\text{A}^8$ 、 $\text{A}^9$ 、 $\text{A}^{10}$ 、および  $\text{A}^{11}$  は、 $\text{H}$ 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、 $-\text{N}\text{A}^{12}\text{A}^{13}$ 、 $-\text{O}\text{A}^{12}$ 、および  $-\text{Si}\text{A}^{12}\text{A}^{13}$  から独立して選択されるメンバーである。指数  $j$  および  $k$  は、 $0 \sim 20$  から独立して選択される整数である。  $\text{A}^{12}$  および  $\text{A}^{13}$  は、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、および置換もしくは非置換ヘテロアリールから独立して選択されるメンバーである〕による構造を有する。

20

【0115】

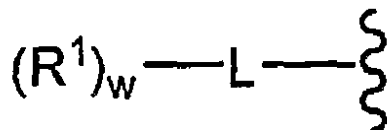
式 III a は式 III のサブセットである。式 III a によって記載された構造は式 I I によっても包含される。

30

【0116】

代表的な実施形態において、

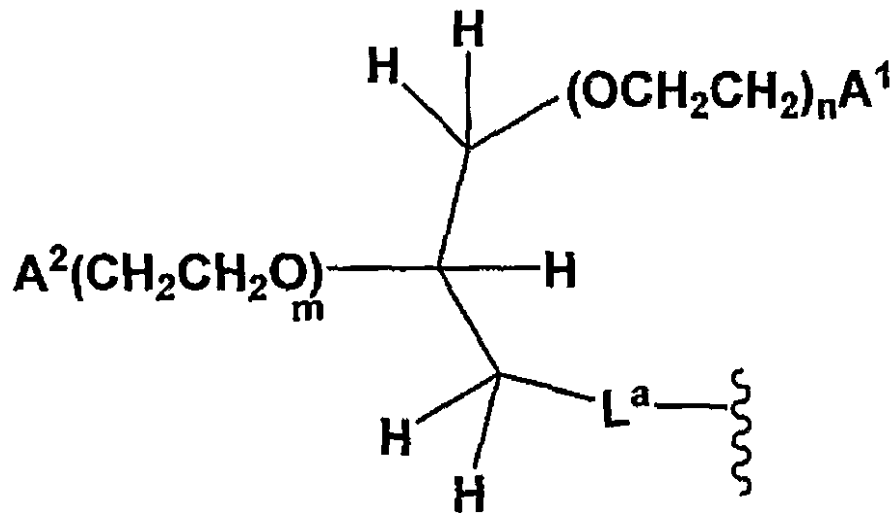
【化 2 0】



40

は次式

【化 2 1】



10

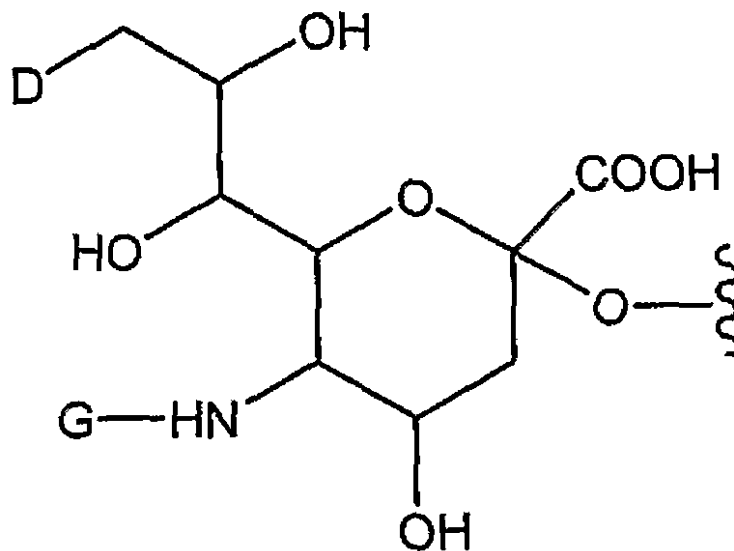
[ 代表的な実施形態において、 $A^1$  および  $A^2$  は各々 - OCH<sub>3</sub> または H である ] による構造を有する。

20

【 0 1 1 7 】

1 つの実施形態において、本発明は、部分

【化 2 2】



30

40

[ 式中、D は - OH および  $R^1 - L - HN -$  から選択されるメンバーであり、G は H および  $R^1 - L -$  および - C(O)(C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>) アルキルから選択されるメンバーであり、 $R^1$  は直鎖 - 鎖または分岐ポリ(エチレングリコール) 残基を含んで成る部分であり、L はリンカー、例えば、結合(「ゼロ順位」、置換もしくは非置換アルキル、および置換もしくは非置換ヘテロアルキルである。代表的な実施形態において、D が OH である場合、G は  $R^1 - L -$  であり、G が - C(O)(C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>) アルキルである場合、D は  $R^1 - L - NH -$  である ] を含んで成る G - C S F ペプチドを提供する。

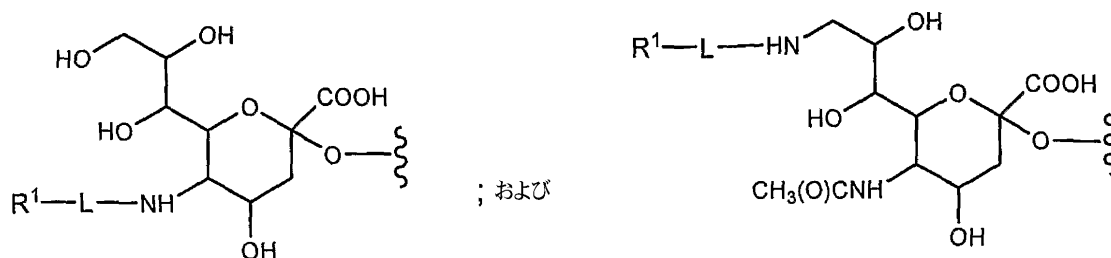
【 0 1 1 8 】

別の代表的な実施形態において、本発明は、本発明の修飾糖と基質 G - C S F ペプチド

50

との間に形成されるコンジュゲートを提供する。本実施形態において、修飾糖の糖部分は、ペプチド基質と修飾基との間に挿入されたグリコシル連結基になる。代表的なグリコシル連結基が無傷グリコシル連結基であるが、ここで連結基を形成するグリコシル部分は、化学的（例えば、メタ過ヨウ素酸ナトリウム）または酵素的（例えば、オキシダーゼ）方法によって分解されない。本発明の選択コンジュゲートは、アミノ - サッカリド、例えば、マンノサミン、グルコサミン、ガラクトサミン、シアル酸等のアミン部分に結合されている修飾基を含む。本モチーフに記載の代表的な修飾基 - 無傷グリコシル連結基カセットは、式

【化 2 3】



10

を有するものなどのシアル酸構造に基づく。

【 0 1 1 9 】

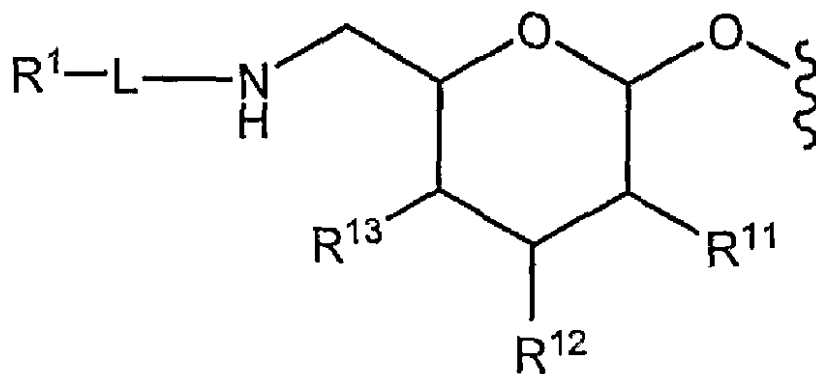
上式において、 $R^1$  および  $L$  は上記の通りである。代表的な  $R^1$  基の構造に関する詳細が以下に示されている。

20

【 0 1 2 0 】

さらに代表的な実施形態において、コンジュゲートは、基質  $G - C S F$  とサッカリール部分との間に形成されるが、ここで修飾基はリンカーによりサッカリール部分の 6 炭素位置で結合されている。したがって、本実施形態に記載の例示的なコンジュゲートは式

【化 2 4】



30

[ 式中、ラジカルは上記の通りである ] を有する。かかるサッカリール部分は、グルコース、グルコサミン、 $N$  - アセチル - グルコサミン、ガラクトース、ガラクトサミン、 $N$  - アセチル - ガラクトサミン、マンノース、マンノサミン、 $N$  - アセチル - マンノサミンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 2 1 】

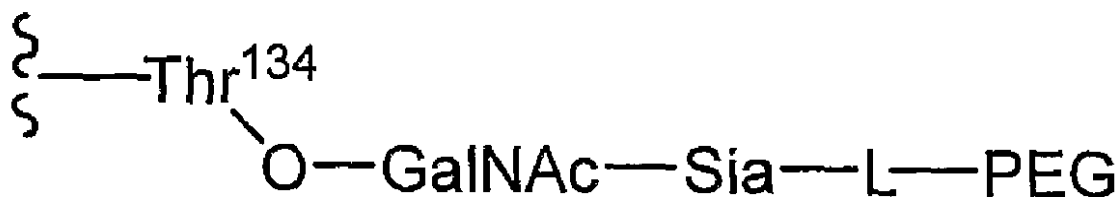
$G - C S F$  など治療的ペプチド上の修飾グリコシル残基に利用可能な方法の多用途性により、本発明のペプチドコンジュゲート上のグリコシル構造は実質的に任意の構造を有する。さらに、グリカン は  $O$  連結または  $N$  連結でありうる。下記で例示される通り、上記のピラノースおよびフラノース誘導体の各々がペプチドのグリコシル部分の成分でありうる。

40

50

## 【 0 1 2 2 】

別の代表的な実施形態において、本発明はG - C S F ペプチドコンジュゲートを提供するが、ここで修飾グリコシル残基（グリコシル連結基を含む）はT h r <sup>1 3 3</sup>にある（配列がM e t で始まる場合はT h r <sup>1 3 4</sup>）。本実施形態に記載の代表的な式は部分【化 2 5】



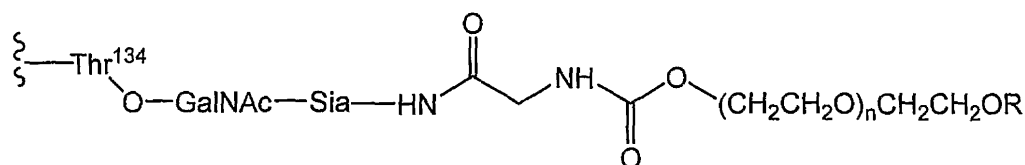
10

〔式中、Lは、0順位リンカー、置換もしくは非置換アルキル、および置換もしくは非置換ヘテロアルキル部分であるリンカーである。代表的なリンカーが天然または非天然アミノ酸のアミドまたはカルバメートである（例えば、-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>NHC(O)-）が、ここで指数sは1～20の整数を表す。ポリ（エチレングリコール）（PEG）部分は、約100kDまでの分子量を有しうる。代表的なPEG部分はほぼ1kDa、2kDa、5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa、または80kDaである。PEG部分は、本明細書に記載のものなど線状または分岐PEG種である。リンカーに結合されていないPEG部分の末端は、OHまたは別の部分のいずれか、例えば、O-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)置換もしくは非置換アルキル基でありうる。OMeが現在、好ましい。〕を含む。

20

## 【 0 1 2 3 】

さらに代表的な実施形態において、本発明の糖PEG化G - C S Fは基礎構造【化 2 6】



30

〔式中、Rおよびnは上記の通りである〕を含む。リンカー腕 - PEGカセットは任意の位置でシアル酸に結合されている。炭素5での窒素は現在、好ましいが、炭素9でのヒドロキシルはアミンで置換され、上記の通り官能化されうる。

## 【 0 1 2 4 】

上記の図式の各々において、グリコシル化部位は位置134でのトレオニンとして表される。図式は、末端のメチオニンを含むG - C S F ペプチドに関する。図式は、末端のメチオニンを含むことがないG - C S F ペプチドにも関するが、この場合、上記図式の各々T h rは適切にT h r <sup>1 3 3</sup>と標識される。

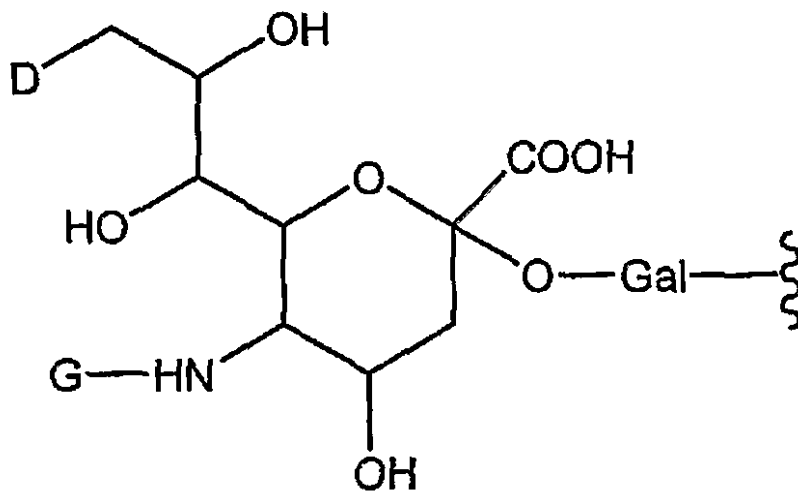
40

## 【 0 1 2 5 】

本発明は、式



【化 2 7】



10

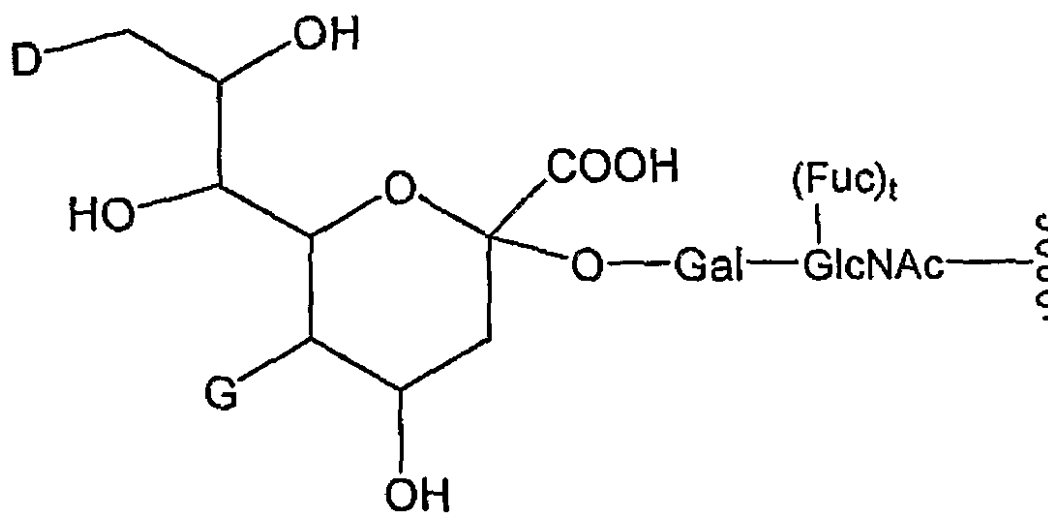
を有するグリコシル基を含む修飾 G - C S F ペプチドを提供する。

【 0 1 2 6】

20

他の実施形態において、基は式

【化 2 8】



30

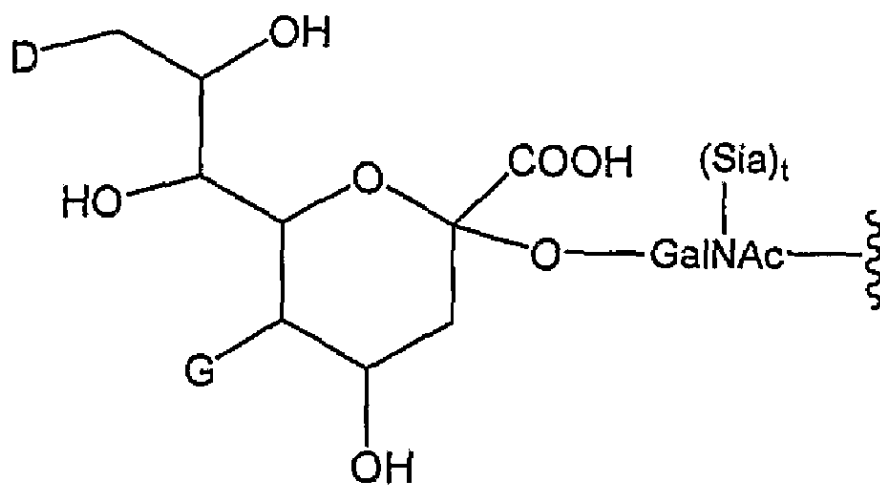
[ 式中、指数 t は 0 または 1 である ] を有する。

【 0 1 2 7】

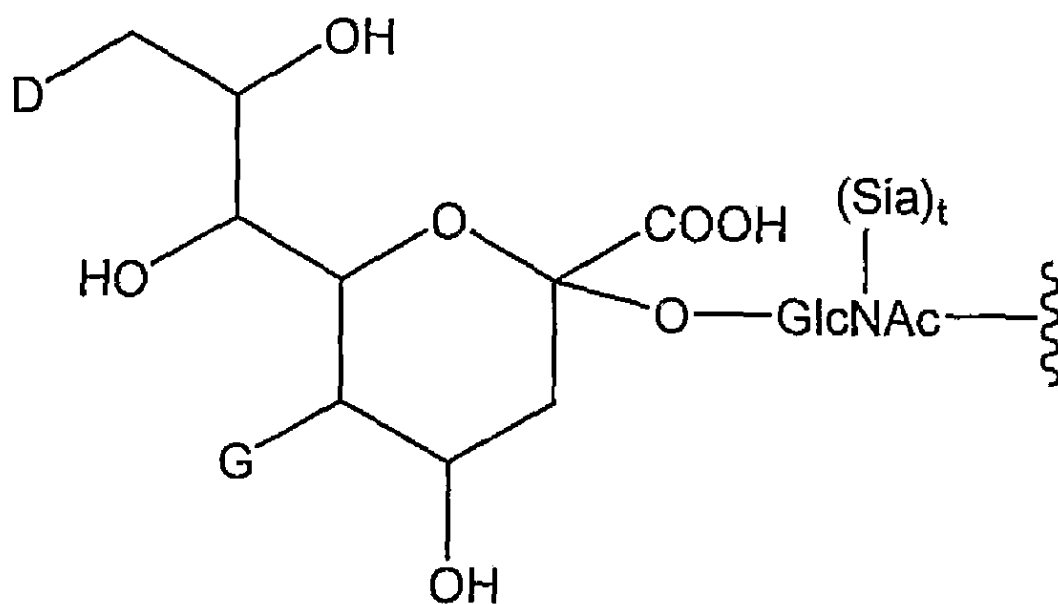
40

さらに代表的な実施形態において、基は次式

【化 2 9】



10



20

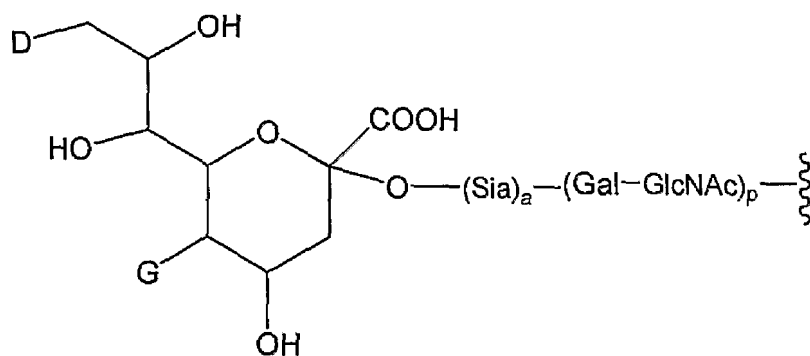
30

[ 式中、指数  $t$  は 0 または 1 である ] から選択されるメンバーである構造を有する。

【 0 1 2 8】

さらに別の実施形態において、基は式

【化 3 0】



40

50

[ 式中、指数  $p$  は 1 ~ 10 の整数を表し、 $a$  は 0 または 1 のいずれかである ] を有する。

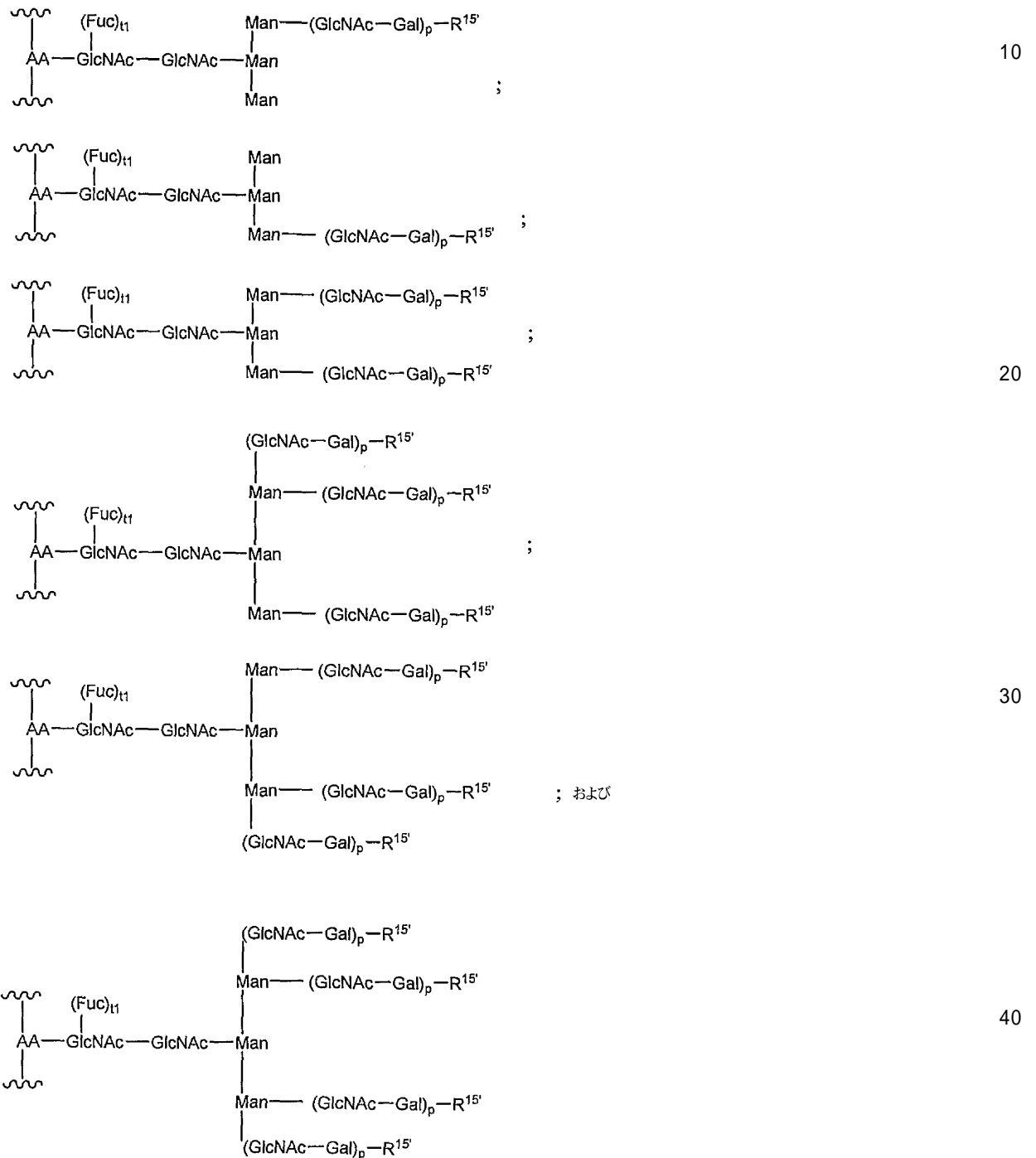
【 0 1 2 9 】

上記の式の各々に記載の代表的な実施形態において、PEGグリコシル連結基は G - C S F の T h r 1 3 3 ( T h r 1 3 4 ) で結合されている。

【 0 1 3 0 】

代表的な実施形態において、本発明の糖PEG化G - C S Fペプチドは、下記

【 化 3 1 】



のグリコシル残基から選択される少なくとも1つのN - 連結グリコシル残基を含む。

【 0 1 3 1 】

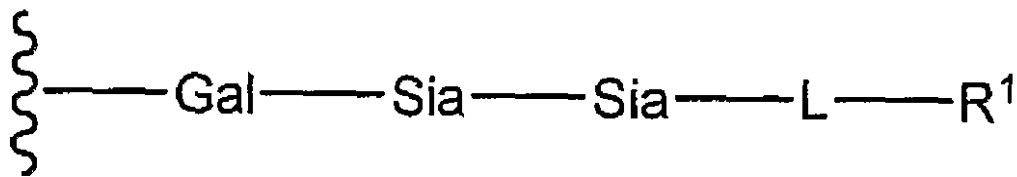
上式において、指数  $t_1$  は 0 または 1 であり、指数  $p$  は 1 ~ 10 の整数である。記号  $R^{15'}$  は、H、OH (例えば、G a l - O H)、シアリル部分、ポリマー修飾シアリル部分 (すなわち、グリコシル連結基 - ポリマー修飾部分 (S i a - L - R<sup>1</sup>)) またはポリ

マー修飾シアリル部分に結合しているシアリル部分（例えば、 $\text{Sia} - \text{Sia} - \text{L} - \text{R}^1$ ）（「 $\text{Sia} - \text{Sia}^P$ 」）。代表的なポリマー修飾サッカリール部分は式 I および II に記載の構造を有する。本発明の代表的な G - C S F ペプチドは、式 I または II に記載の構造を含む  $\text{R}^{15}$  を有する少なくとも 1 つのグリカンを含む。式 I および II の開放価を有する酸素は、好ましくは、グリコシルリンケージにより Gal または Gal Nac 部分の炭素に結合されている。さらに代表的な実施形態において、酸素はガラクトース残基の位置 3 で炭素に結合されている。代表的な実施形態において、修飾シアル酸は 2, 3 でガラクトース残基に連結されている。別の代表的な実施形態において、シアル酸は 2, 6 でガラクトース残基に連結されている。

【0132】

別の代表的な実施形態において、本発明は、ペプチドのアミノ酸残基に共有結合されている上記のものなどグリコシル連結基を含む G - C S F ペプチドコンジュゲートを提供する。本モチーフによる 1 つの実施形態において、グリコシル連結部分は、 $\text{Sia}$  残基によりガラクトース残基に連結されている。

【化 3 2】

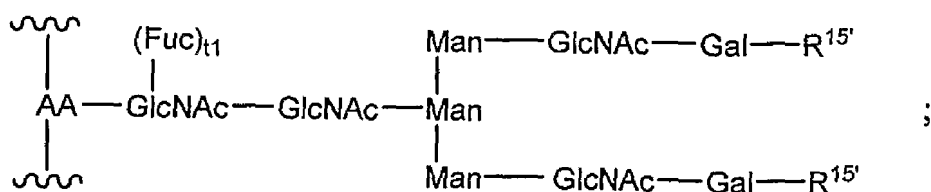
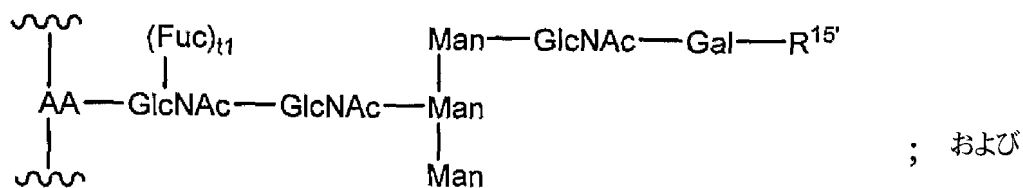
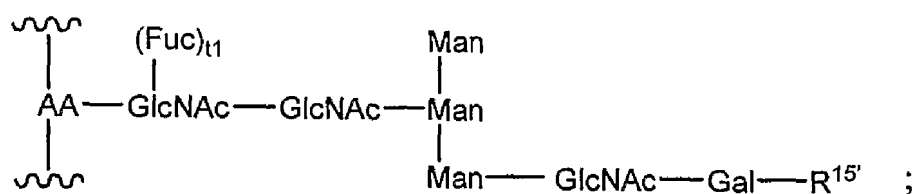


本モチーフによる代表的な種が、 $\text{Sia} - \text{Sia}$  結合形成する酵素、例えば、CST - I I、ST8Sia - I I、ST8Sia - I I I、および ST8Sia - I V を使用することにより、 $\text{Sia} - \text{L} - \text{R}^1$  をグリカンの末端のシアル酸にコンジュゲートすることによって調製される。

【0133】

別の代表的な実施形態において、グリカンは基

【化 3 3】



10

20

30

40

50

【 0 1 3 4 】

10

【 0 1 3 5 】

【 0 1 3 6 】

20

【 0 1 3 7 】

代表的な実施形態において、グリコシル連結部分は式

【化 3 4】



【 0 1 3 8 】

さらに別の代表的な実施形態において、本発明は、基礎構造

【化 3 5】

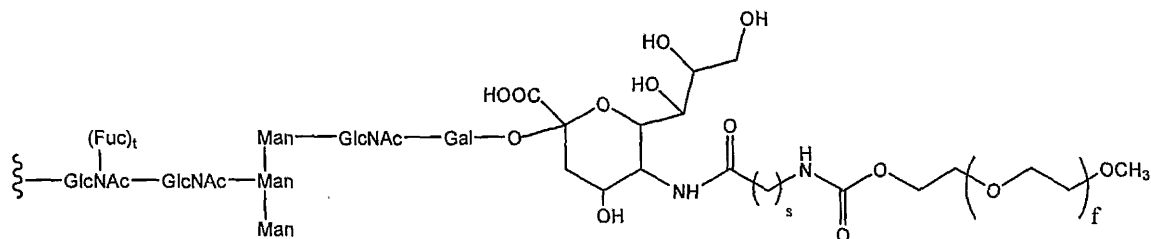


50

## 【 0 1 3 9 】

別の代表的な実施形態において、G - C S Fは昆虫細胞由来であり、G l c N A cおよびG a lをマンノースコアに添加することによって再構築され、線状P E G部分を有するシアル酸を使用することにより糖P E G化され、式

## 【 化 3 6 】



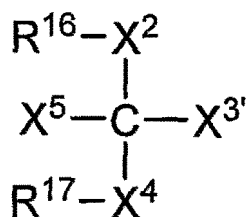
10

[ 式中、s は 1 ~ 1 0 の整数を表し、f は 1 ~ 2 5 0 0 の整数を表す ] を有する少なくとも 1 つの部分を含んで成る G - C S F ペプチドを与える。

## 【 0 1 4 0 】

本明細書で論じるように、本発明のコンジュゲートにおいて使用される P E G は線状または分岐でありうる。本発明の本実施形態による分岐コンジュゲートを形成するために使用する代表的な前駆体は式

## 【 化 3 7 】



(III)

20

を有する。

## 【 0 1 4 1 】

本式による分岐ポリマー種は基本的に純粋な水溶性ポリマーである。X<sup>3</sup> は、イオン性の、例えば、O H、C O O H、H<sub>2</sub> P O<sub>4</sub>、H S O<sub>3</sub>、H P O<sub>3</sub>、およびその塩等、または他の反応官能基、例えば、下記を含む部分である。C は炭素である。X<sup>5</sup> は、好ましくは、非反応基（例えば、H、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル）であり、ポリマー腕でありうる。R<sup>16</sup> および R<sup>17</sup> は独立して選択されるポリマー腕、例えば、非ペプチド、非反応性ポリマー腕（例えば、P E G）である。X<sup>2</sup> および X<sup>4</sup> は、好ましくは、同じまたは異なりうる生理的条件下に基本的に非反応性であるリンケージ断片である。代表的なリンカーは芳香族部分もエステル部分も含まない。あるいは、これらのリンケージは、生理的に関連性のある条件下に分解するように考えられている 1 つもしくはそれ以上の部分、例えば、エステル、ジスルフィド等を含みうる。X<sup>2</sup> および X<sup>4</sup> は、ポリマー腕 R<sup>16</sup> および R<sup>17</sup> を C に結合する。X<sup>3'</sup> がリンカー、糖、またはリンカー - 糖力セットに対する相補的反応性の反応官能基と反応すると、X<sup>3'</sup> はリンケージ断片 X<sup>3</sup> の成分に変換される。

30

40

## 【 0 1 4 2 】

X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、および X<sup>4</sup> の代表的なリンケージ断片は独立して選択され、S、S C ( O ) N H、H N C ( O ) S、S C ( O ) O、O、N H、N H C ( O )、( O ) C N H、および N H C ( O ) O、および O C ( O ) N H、C H<sub>2</sub> S、C H<sub>2</sub> O、C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> O、C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> S、( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> O、( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> S または ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> Y' - P E G を含み、ここで Y' は S、N H、N H C ( O )、C ( O ) N H、N H C ( O ) O、O C ( O ) N H

50

、または0であり、 $\alpha$ は1～50の整数である。代表的な実施形態において、リンケージ断片 $X^2$ および $X^4$ は異なるリンケージ断片である。

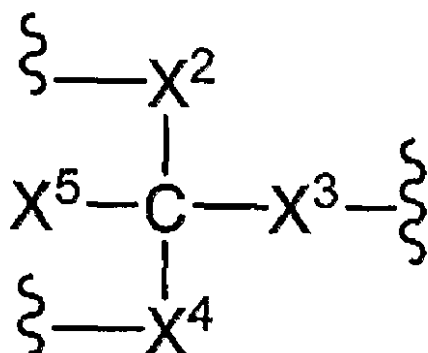
【0143】

代表的な実施形態において、前駆体(III)、またはその活性化誘導体は、 $X^{3'}$ と糖部分上の相補的反応性の基、例えば、アミンとの間の反応により糖、活性化糖、または糖ヌクレオチドと反応、かつそれによって、これらに結合される。あるいは、 $X^{3'}$ は、リンカー、Lに対する前駆体上の反応官能基と反応する。式IおよびIIの $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、または $R^{6'}$ の1つもしくはそれ以上が、分岐ポリマー修飾部分を含み、またはこの部分がLにより結合されうる。

【0144】

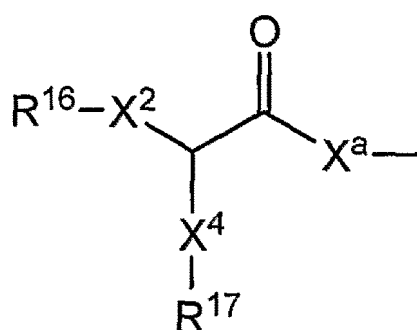
代表的な実施形態において、部分

【化38】



はリンカー腕、Lである。本実施形態において、代表的なリンカーは、天然または非天然アミノ酸、アミノ酸類似体もしくはアミノ酸模倣剤、または1つもしくはそれ以上のかかる種から形成された小ペプチド由来である。例えば、本発明の化合物に存在するある分岐ポリマーは式

【化39】



(IV)

を有する。

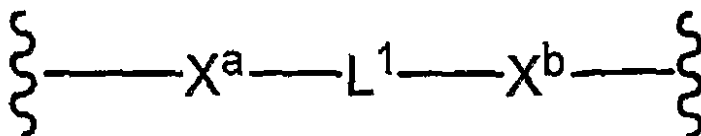
【0145】

$X^a$ は、分岐ポリマー修飾部分の前駆体、および糖部分での反応官能基、またはリンカーへの前駆体に対する、反応官能基、例えば、 $X^{3'}$ の反応によって形成されるリンケージ断片である。例えば、 $X^{3'}$ がカルボン酸である場合、これは活性化され、アミノ-サッカリドから懸垂するアミン基(例えば、 $Sia$ 、 $GalNH_2$ 、 $GlcnH_2$ 、 $ManNH_2$ 等)に直接結合され、アミドである $X^a$ を形成する。追加の代表的な反応官能基および活性化前駆体は以下に記載されている。指数cは1～10の整数を表す。他の記号は上記のものと同一性を有する。

【 0 1 4 6 】

別の代表的な実施形態において、 $X^a$  は別のリンカー

【 化 4 0 】



10

[ 式中、 $X^b$  は第 2 のリンケージ断片であり、 $X^a$  について記載されている基から独立して選択され、かつ、 $L$  と同様に、 $L^1$  は、結合、置換もしくは非置換アルキル、または置換もしくは非置換ヘテロアルキルである ] で形成された連結部分である。

【 0 1 4 7 】

$X^a$  および  $X^b$  の代表的な種としては、 $S$ 、 $SC(O)NH$ 、 $HNC(O)S$ 、 $SC(O)O$ 、 $O$ 、 $NH$ 、 $NHC(O)$ 、 $C(O)NH$  および  $NHC(O)O$ 、および  $OC(O)NH$  が挙げられる。

【 0 1 4 8 】

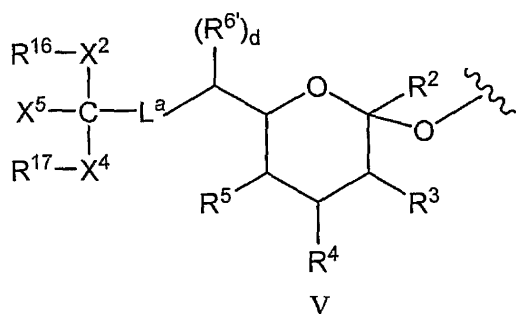
別の代表的な実施形態において、 $X^4$  は、アミノ酸、ジペプチド（例えば、 $Lys-Lys$ ）、またはトリペプチド（例えば、 $Lys-Lys-Lys$ ）である  $R^{1-7}$  に結合されたペプチドであり、ここでアルファ-アミン部分および/または側鎖ヘテロ原子はポリマー修飾部分で修飾される。

20

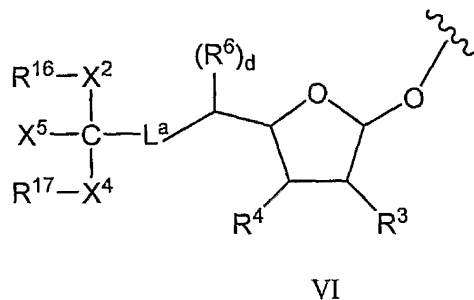
【 0 1 4 9 】

さらに代表的な実施形態において、本発明のコンジュゲートは、部分、例えば、

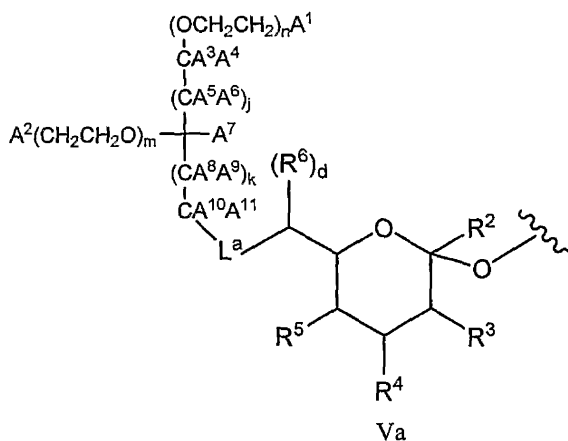
【 化 4 1 】



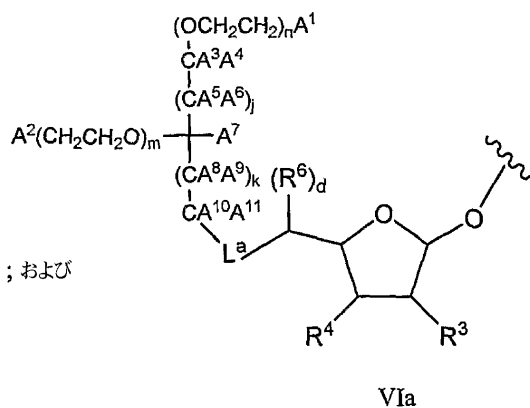
; および



30



; および



40

から選択される式 [ 式中、さまざまな記号によって表されるラジカルの同一性は、上記のものと同じである。  $L^a$  は  $L$  および  $L^1$  の上記の通り結合またはリンカーであり、例えば

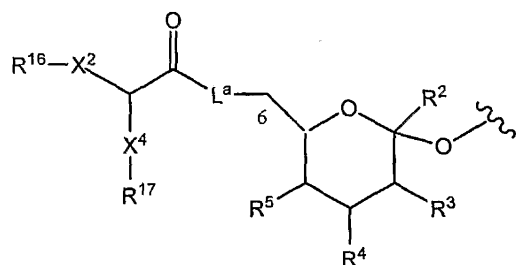
50



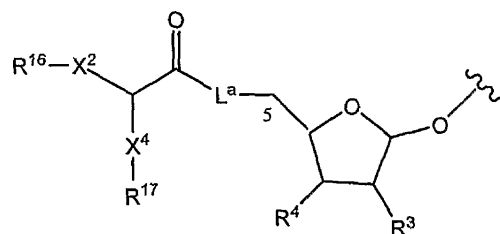
、置換もしくは非置換アルキル、または置換もしくは非置換ヘテロアルキル部分である。代表的な実施形態において、 $L^a$  は、示される通りポリマー修飾部分で官能化されているシアル酸の側鎖の部分である。代表的な  $L^a$  部分は、1 つもしくはそれ以上の  $OH$  または  $NH_2$  を含む置換もしくは非置換アルキル鎖を含む] を有する  $R^{1-5}$  部分である。

【0150】

さらに別の代表的な実施形態において、本発明は、部分、例えば、式【化42】



VII

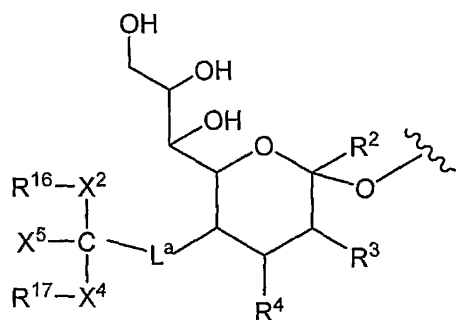


VIII

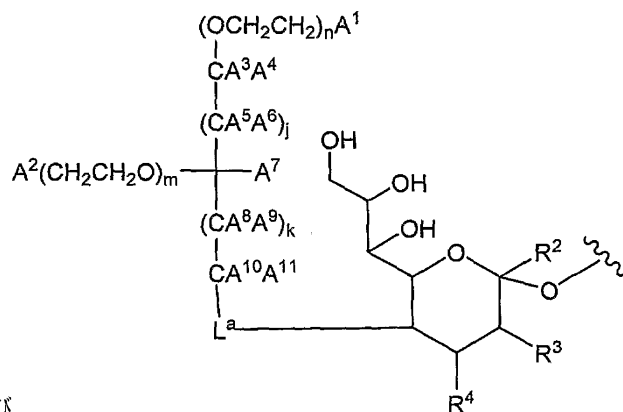
による  $R^{1-5}$  部分を有するコンジュゲートを提供する。さまざまな記号によって表されるラジカルの同一性は、上記のものと同じである。当業者であれば、式VIIおよびVIIIにおけるリンカー腕が同等に本明細書に記載の他の修飾糖に適用可能であることを十分に理解するであろう。代表的な実施形態において、式VIIおよびVIIIの種は、本明細書に記載のグリカン構造に結合した  $R^{1-5}$  部分である。

【0151】

さらに別の代表的な実施形態において、G-CSFペプチドは式【化43】



および



[式中、ラジカルの同一性は上記の通りである。 $L^a$  の代表的な種は、 $-(CH_2)_jC(O)NH(CH_2)_hC(O)NH-$  であり、ここで指数  $h$  および  $j$  は 0 ~ 10 の独立して選択される整数である。さらに代表的な種が  $-C(O)NH-$  である。指数  $j$  および  $k$  は 0 ~ 20 の独立して選択される整数である。指数  $m$  および  $n$  は 0 ~ 5000 の独立して選択される整数である。 $A^1$ 、 $A^2$ 、 $A^3$ 、 $A^4$ 、 $A^5$ 、 $A^6$ 、 $A^7$ 、 $A^8$ 、 $A^9$ 、 $A^{10}$ 、および  $A^{11}$  は、H、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、 $-NA^{12}A^{13}$ 、 $-OA^{12}$ 、および  $-SiA^{12}A^{13}$  から独立して選択されるメンバーである。 $A^{12}$  および  $A^{13}$  は、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、および置換もしくは非置換ヘテロアリールから独立して選択され

るメンバーである ] による  $R^{15}$  部分を含む。

【 0 1 5 2 】

上記の本発明の実施形態は、さらに、ポリマーが水溶性ポリマー、詳しくは、ポリ(エチレングリコール)(「PEG」)、例えば、メトキシ-ポリ(エチレングリコール)である種を参照することにより例示される。当業者は、以下の焦点が説明の明確さのためであり、代表的なポリマーとしてPEGを使用する記載されたさまざまなモチーフが、PEG以外のポリマーが使用される種に同等に適用可能であることを十分に理解するであろう。

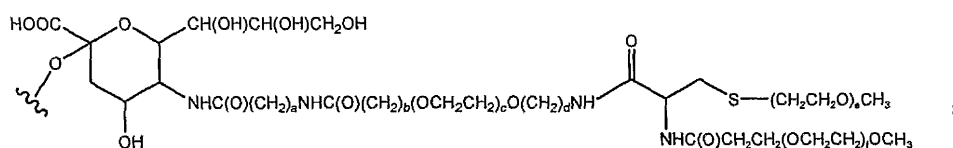
【 0 1 5 3 】

任意の分子量、例えば、1 KDa、2 KDa、5 KDa、10 KDa、15 KDa、20 KDa、25 KDa、30 KDa、35 KDa、40 KDa、45 KDa、50 KDa、55 KDa、60 KDa、65 KDa、70 KDa、75 KDa、または80 KDaのPEGが本発明において使用される。

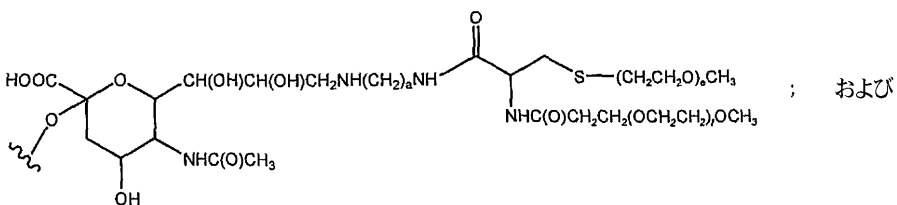
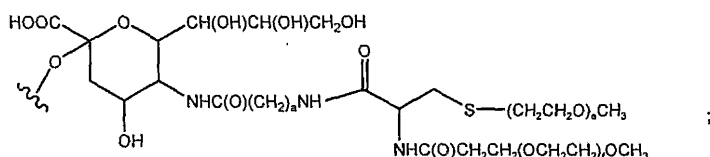
【 0 1 5 4 】

代表的な実施形態において、 $R^{15}$  部分は基

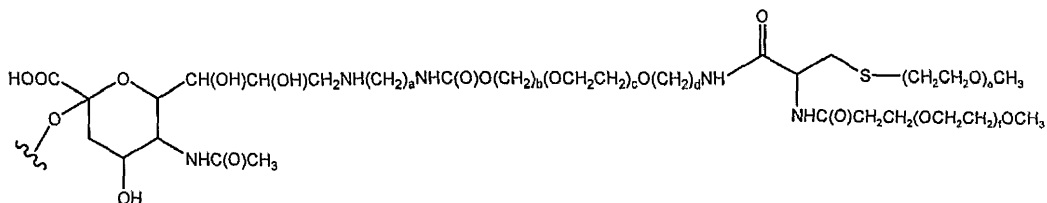
【 化 4 4 】



20



30



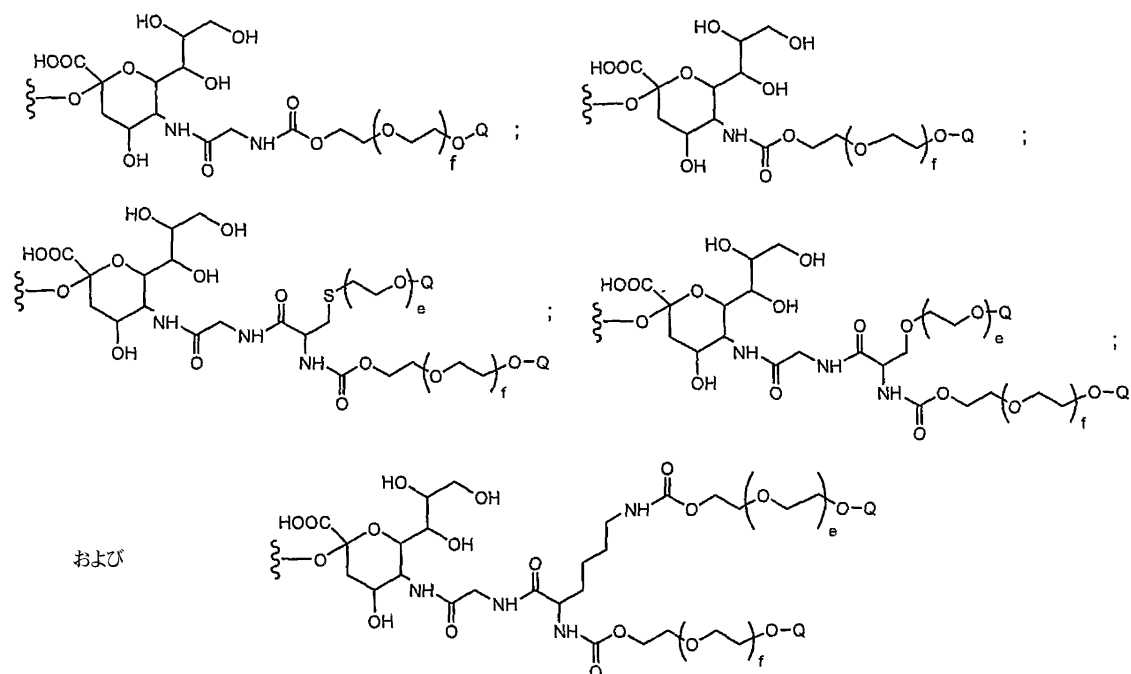
40

から選択されるメンバーである式を有する。上記構造の各々において、リンカー断片 -  $NH(CH_2)_a$  - は存在または非存在でありうる。

【 0 1 5 5 】

他の代表的な実施形態において、コンジュゲートは基

## 【化 4 5】



10

から選択される  $R^{1-5}$  部分を含む。

## 【0156】

上式の各々において、指数  $e$  および  $f$  は独立して 1 ~ 2500 の整数から選択される。さらに代表的な実施形態において、 $e$  および  $f$  は、約 1 KDa、2 KDa、5 KDa、10 KDa、15 KDa、20 KDa、25 KDa、30 KDa、35 KDa、40 KDa、45 KDa、50 KDa、55 KDa、60 KDa、65 KDa、70 KDa、75 KDa、または 80 KDa である PEG 部分を提供するように選択される。記号  $Q$  は、置換もしくは非置換アルキル（例えば、 $C_1 - C_6$  アルキル、例えば、メチル）、置換もしくは非置換ヘテロアルキルまたは  $H$  を表す。

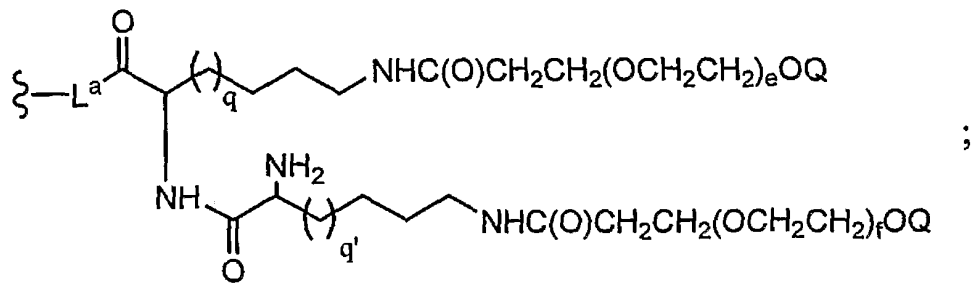
## 【0157】

他の分岐ポリマーは、ジ - リシン (Lys - Lys) ペプチド、例えば、

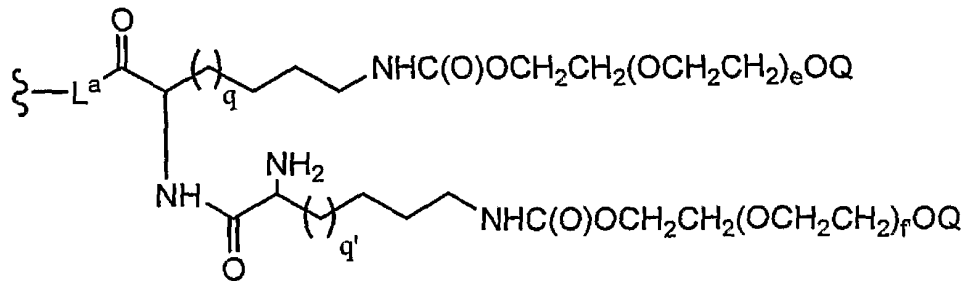
20

30

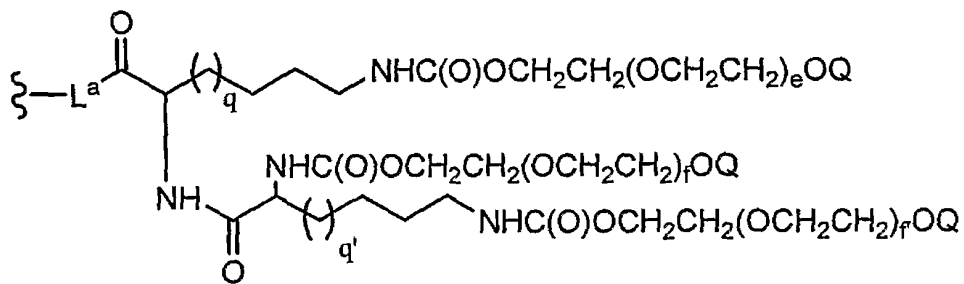
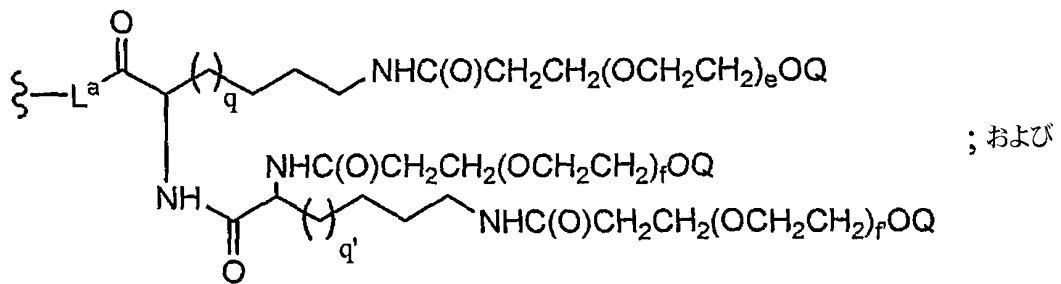
【化 4 6】



10



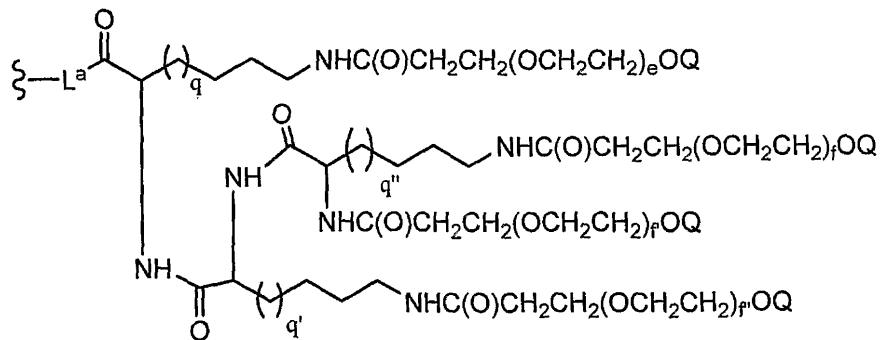
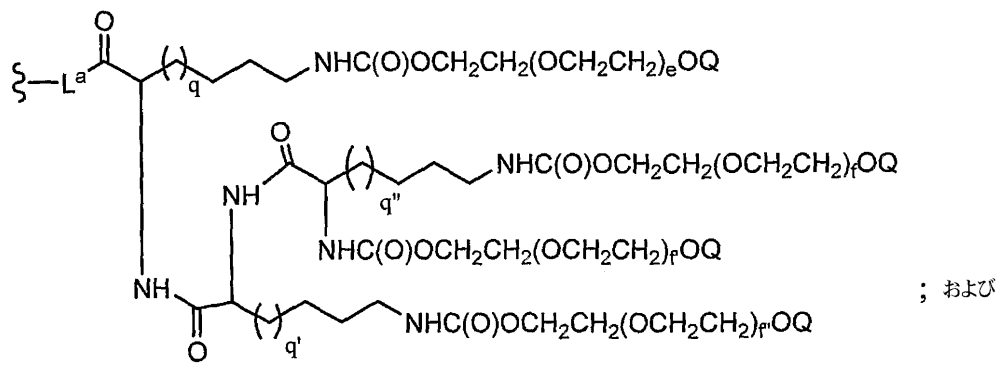
20



30

およびトリ - リシン ( L y s - L y s - L y s ) 、例えば、

## 【化 4 7】

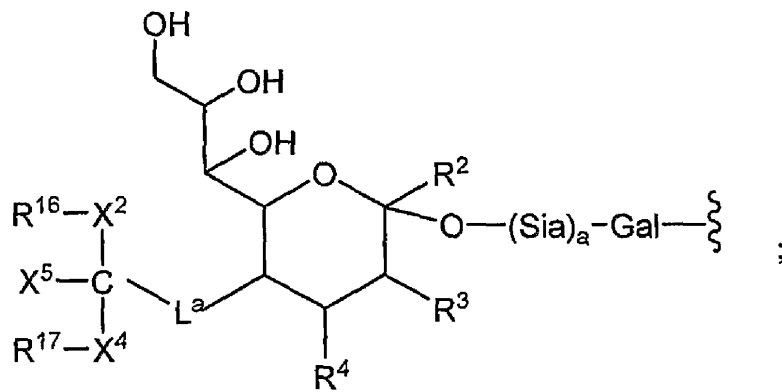


に基づく構造を有する。上記の図の各々において、 $e$ 、 $f$ 、 $f'$ 、および $f''$ は独立して1～2500から選択される整数を表す。指数 $q$ 、 $q'$ および $q''$ は独立して1～20から選択される整数を表す。

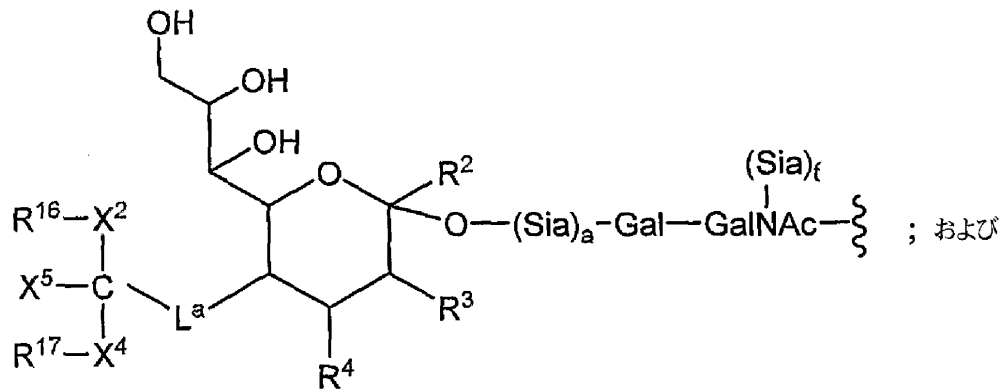
## 【0158】

別の代表的な実施形態において、G-C-S-Fペプチドは式

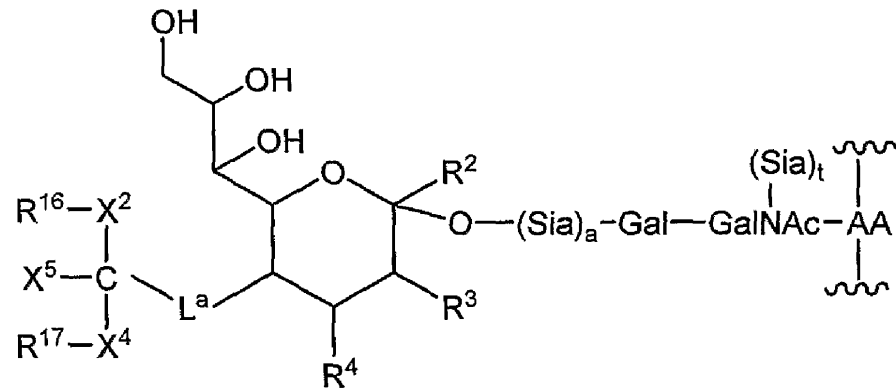
【化 4 8】



10



20



30

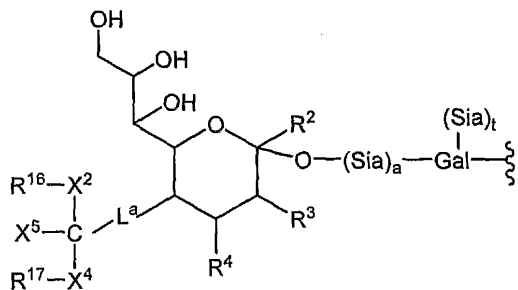
[ 式中、 $L^a$  は、本明細書に記載された結合またはリンカーであり、指数  $t$  は 0 または 1 を表し、指数  $a$  は 0 または 1 を表す。これらの基の各々は、上記の一、二、三、および四触角のサッカリド構造の成分として包含されうる ] から選択されるグリコシル部分を含んで成る。

【 0 1 5 9 】

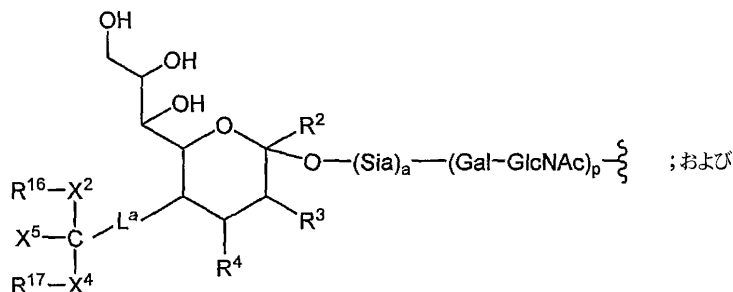
さらに別の実施形態において、本発明のコンジュゲートは、

40

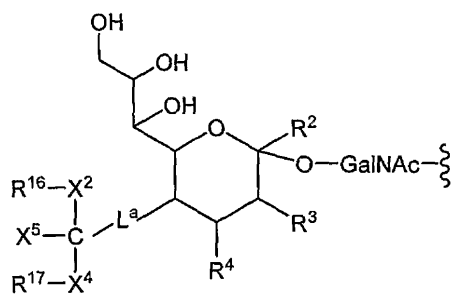
## 【化 4 9】



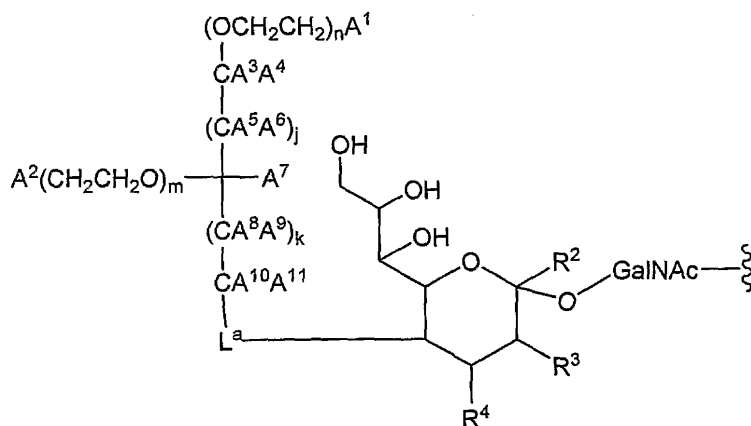
10



20



および



30

40

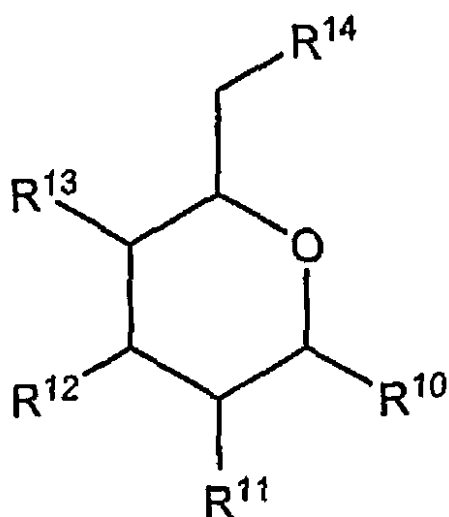
[ 式中、指数  $a$  およびリンカー  $L^a$  は上記の通りである。指数  $p$  は 1 ~ 10 の整数である。指数  $t$  および  $a$  は独立して 0 または 1 から選択される。これらの基の各々は、上記の一、二、三、および四触角のサッカリド構造の成分として包含されうる ] から選択される基礎構造を含む修飾グリコシル残基を含む。

## 【 0 1 6 0 】

さらに代表的な実施形態において、本発明は、上記のものなどのリンカー修飾基カセットを生み出す、対応するアミン部分に 6 - ヒドロキシル位置が変換される修飾糖を使用する。これらの修飾糖のコアとして使用されうる代表的なサッカリール基としては、Gal、GalNAc、Glc、GlcNAc、Fuc、Xyl、Man などが挙げられる。本実施形態による代表的な修飾糖は式

50

【化50】



10

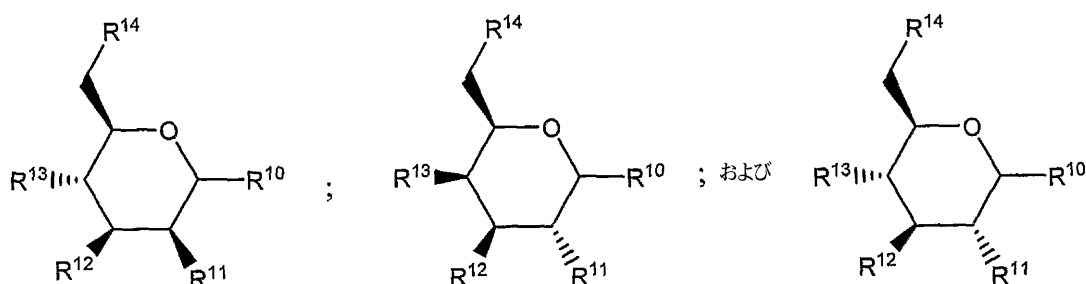
[式中、 $R^{11} - R^{14}$ は、 $H$ 、 $OH$ 、 $C(O)CH_3$ 、 $NH$ 、および $NHC(O)CH_3$ から独立して選択されるメンバーである。 $R^{10}$ は、別のグリコシル残基( $-O-$ グリコシル)または $G-CSF$ ペプチドのアミノ酸( $-NH-(G-CSF)$ )とのリンクである。 $R^{14}$ は、 $OR^1$ 、 $NHR^1$ 、または $NH-L-R^1$ である。 $R^1$ および $NH-L-R^1$ は上記の通りである]を有する。

20

【0161】

本モチーフによる選択コンジュゲートは、マンノース、ガラクトース、もしくはグルコース、またはマンノース、ガラクトース、もしくはグルコースの立体化学反応を有する種に基づく。これらのコンジュゲートの一般式は、

【化51】



30

である。

【0162】

上記の通り、本発明は、修飾基、これらの種の活性化類似体、およびペプチドや脂質および本発明の修飾サッカリドなどの種間に形成されたコンジュゲートを有するサッカリドを提供する。

40

【0163】

修飾糖

本発明では修飾糖および修飾糖ヌクレオチドを使用し、修飾糖のコンジュゲートを形成する。本発明において使用される修飾糖化合物において、糖部分は、好ましくは、サッカリド、デオキシ-サッカリド、アミノ-サッカリド、または $N$ -アシルサッカリドである。「サッカリド」およびその等価物、「サッカリール」、「糖」、および「グリコシル」という語は、モノマー、二量体、オリゴマー、およびポリマーを指す。糖部分は修飾基で官能化もされる。修飾基は、一般的に、糖上のアミン、スルフヒドリル、またはヒドロキ

50



シル、例えば、一級ヒドロキシル、部分とのコンジュゲーションにより、糖部分にコンジュゲートされる。代表的な実施形態において、修飾基は、糖上のアミン部分により、例えば、修飾基の反応誘導体とのアミンの反応により形成されるアミド、ウレタン、または尿素により結合される。

#### 【0164】

任意の糖を本発明のコンジュゲートのグリコシル連結基の糖コアとして使用されうる。本発明の組成物の形成において有用である代表的な糖コアとしては、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、およびシアル酸が挙げられるが、これらに限定されない。他の有用な種としては、グルコサミン、ガラクトサミン、マンノサミン、シアル酸の5-アミン類似体などのアミノ糖が挙げられる。糖コアは自然に存在する構造でありうるとともに、修飾基をコンジュゲートするための部位を提供するように修飾されうる。例えば、1つの実施形態において、本発明は、9-ヒドロキシ部分がアミンで置換されるシアル酸誘導体を提供する。該アミンは、選択修飾基の活性化類似体で容易に誘導体化される。

#### 【0165】

代表的な修飾糖は、水溶性または水不溶性ポリマーで修飾される。有用なポリマーの例はさらに以下で例示される。

#### 【0166】

##### 水溶性ポリマー

多くの水溶性ポリマーが当業者に周知であり、本発明の実施において有用である。水溶性ポリマーという語は、サッカリド（例えば、デキストラン、アミロース、ヒアルロン酸、ポリ（シアル酸）、ヘパラン、ヘパリン、等）、ポリ（アミノ酸）、例えば、ポリ（アスパラギン酸）、およびポリ（グルタミン酸）、核酸、合成ポリマー（例えば、ポリ（アクリル酸）、ポリ（エーテル）、例えば、ポリ（エチレングリコール）、ペプチド、タンパク質などの種を包含する。本発明は、ポリマーがコンジュゲートの残りの部分を結合することができる点を含む必要があるという唯一の制限とともに水溶性ポリマーで実施されうる。

#### 【0167】

ポリマーの活性化の方法は、国際公開第94/17039号パンフレット、米国特許第5,324,844号明細書、国際公開第94/18247号パンフレット、国際公開第94/04193号パンフレット、米国特許第5,219,564号明細書、米国特許第5,122,614号明細書、国際公開第90/13540号パンフレット、米国特許第5,281,698号明細書、さらに国際公開第93/15189号パンフレット、および活性化ポリマーとペプチド、例えば、凝固因子V I I Iとの間のコンジュゲーション（国際公開第94/15625号パンフレット）、ヘモグロビン（国際公開第94/09027号パンフレット）、酵素を有する分子（米国特許第4,412,989号明細書）、リボヌクレアーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼ（ベロネーゼ（Veronese）ら、App. Biochem. Biotech. 11:141-45頁（1985年））についても確認されうる。

#### 【0168】

好ましい水溶性ポリマーは、ポリマーの試料中のポリマー分子の実質的な割合がほぼ同じ分子量であるものであり、かかるポリマーは「同種分散（homodisperse）」である。

#### 【0169】

本発明はさらに、ポリ（エチレングリコール）コンジュゲートを参照することにより例示される。PEGの官能化およびコンジュゲーションに関するいくつかの検討およびモノグラフが入手可能である。例えば、ハリス（Harris）、Macronol. Chem. Phys. C 25:325-373頁（1985年）、スクーテン（Scouten）、Methods in Enzymology 135:30-65頁（1987年）、ワン（Wong）ら、Enzyme Microb. Technol. 14:866-874頁（1992年）、デルガド（Delgado）ら、Critical Rev

10

20

30

40

50

views in Therapeutic Drug Carrier Systems 9:249-304頁(1992年)、ザリプスキー(Zalipsky)、Bioc onjugate Chem. 6:150-165頁(1995年)、およびバドラー(Bhadra)ら、Pharmazie、57:5-29頁(2002年)を参照。反応性PEG分子を調製し、反応分子を使用してコンジュゲートを形成するための経路は当業界で周知である。例えば、米国特許第5,672,662号明細書は、線状または分岐ポリ(アルキレンオキシド)、ポリ(オキシエチル化ポリオール)、ポリ(オレフィンアルコール)、およびポリ(アクリロモルホリン)から選択されるポリマー酸の活性エステルの水溶性および単離可能なコンジュゲートを開示している。

【0170】

10

米国特許第6,376,604号明細書は、有機溶媒中にジ(1-ベンゾトリアゾイル)炭酸塩とポリマーのヒドロキシルの末端を反応させることによって水溶性および非ペプチドポリマーの水溶性1-ベンゾトリアゾリル炭酸エステルを調製するための方法を記載している。活性エステルは、タンパク質またはペプチドなど生物活性剤とのコンジュゲートを形成するために使用される。

【0171】

国際公開第99/45964号パンフレットは、ポリマー骨格を含んで成り、安定したリンケージによりポリマー骨格との少なくとも1つの末端連結を有する生物活性薬剤および活性化水溶性ポリマーを含んで成るコンジュゲートを記載しているが、ここで少なくとも1つの末端は分岐部分を含んで成り、この分岐部分に近位の反応基連結を有し、ここで生物活性薬剤は近位反応基の少なくとも1つに連結されている。他の分岐ポリ(エチレングリコール)が国際公開第96/21469号パンフレットに記載されており、米国特許第5,932,462号明細書は、反応官能基を含む分岐末端を含む分岐PEG分子で形成されたコンジュゲートを記載している。ポリ(エチレングリコール)と生物活性種との間でコンジュゲートを形成する、タンパク質またはペプチドなど生物活性種と反応させる遊離反応基が入手可能である。米国特許第5,446,090号明細書は、二官能性PEGリンカーおよびPEGリンカー末端の各々でペプチドを有するコンジュゲートの形成におけるその使用を記載している。

20

【0172】

分解性PEGリンケージを含むコンジュゲートが国際公開第99/34833号パンフレット、および国際公開第99/14259号パンフレットのほか、米国特許第6,348,558号明細書に記載されている。かかる分解性リンケージが本発明において利用可能である。

30

【0173】

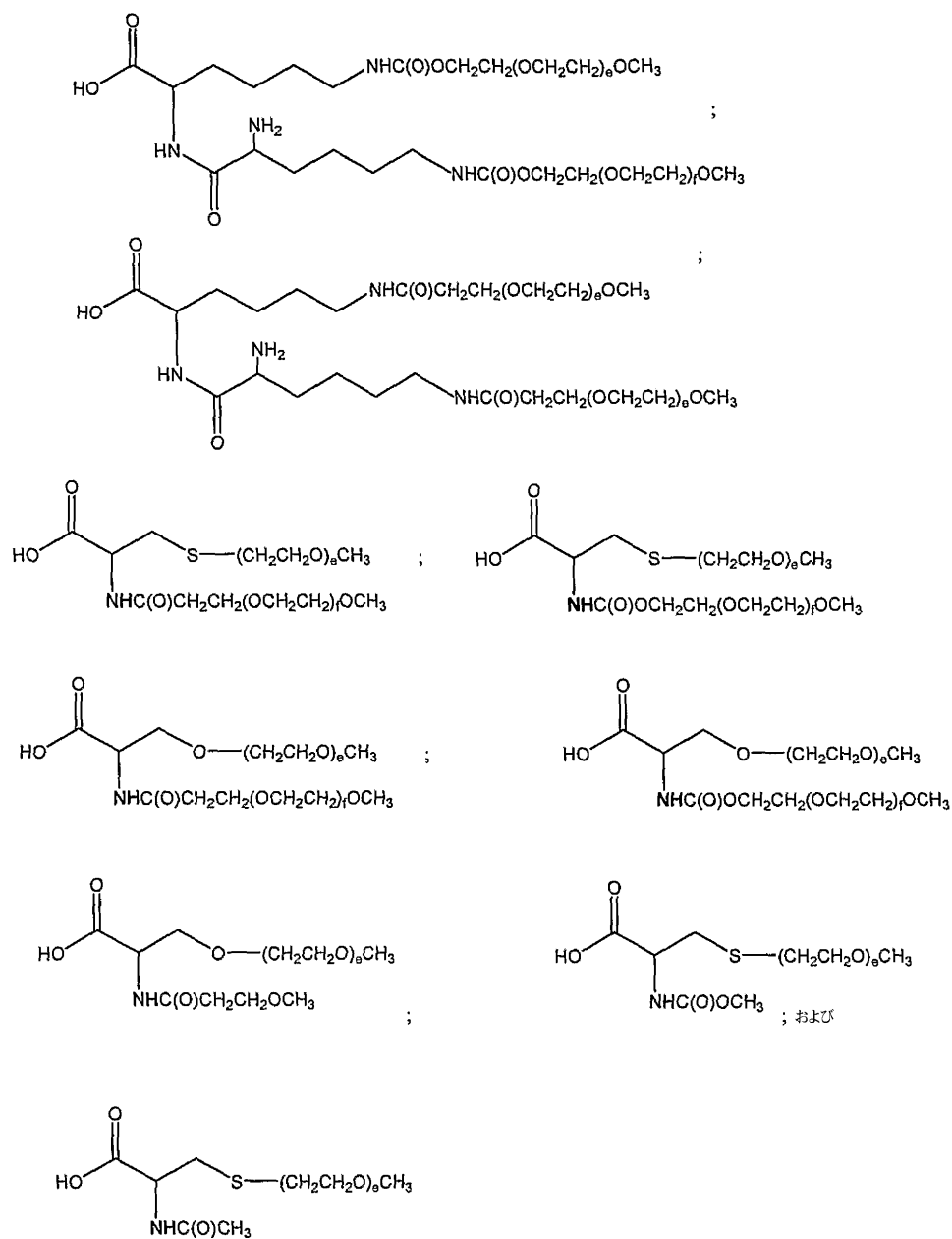
上記のポリマー活性化の当技術分野で承認されている方法は、本明細書に記載の分岐ポリマーの形成における本発明との関連で使用され、これらの分岐ポリマーを他の種、例えば、糖、糖ヌクレオチドなどとのコンジュゲートのためのものでもある。

【0174】

修飾糖は、グリコシルコア(またはコア上のリンカー)をポリマー修飾部分(またはポリマー修飾部分上のリンカー)と接触させることによって調製される。次の議論は、本発明において使用される選択ポリマー修飾部分の例を提供する。例えば、代表的なポリマー修飾部分は、アミノ酸、例えば、セリン、システイン、リシン、および小ペプチド、例えば、lys-lysを含有する側鎖に基づく。代表的な構造は以下を含む。

40

## 【化 5 2】



10

20

30

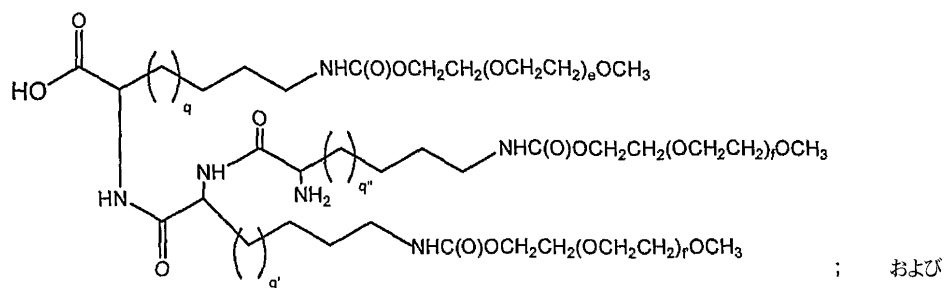
当業者は、ジ - リシン構造における遊離アミンが PEG 部分との amide またはウレタンにより PEG 化されうることも十分に理解するであろう。

## 【 0 1 7 5 】

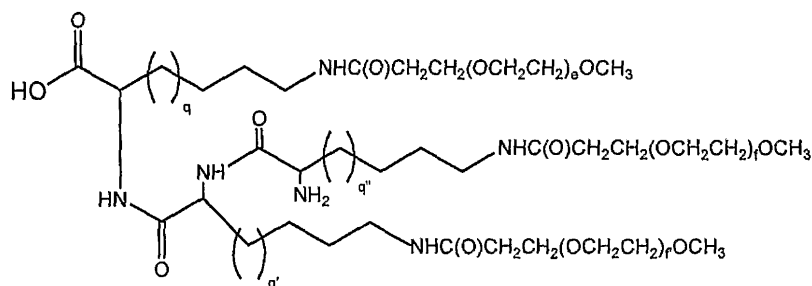
さらに別の実施形態において、分岐 PEG 部分は、トリ - リシンペプチドに基づく。トリ - リシンは、モノ、ジ - 、トリ - 、またはテトラ - PEG 化されうる。本実施形態による代表的な種は式

40

## 【化 5 3】



10



[ 式中、e、f、および f' は、1 ~ 2 5 0 0 から独立して選択される整数であり、かつ 20  
q、q'、および q'' は、1 ~ 2 0 の独立して選択される整数である ] を有する。

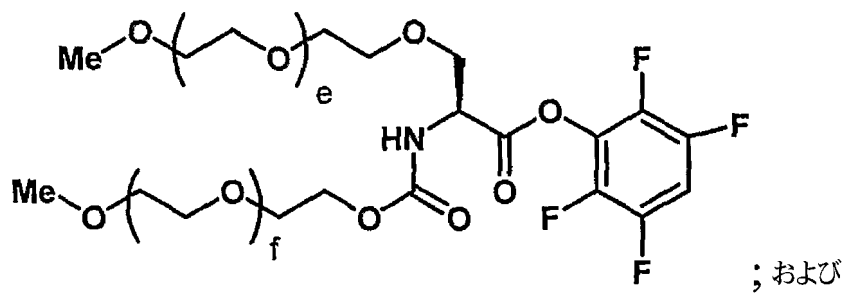
## 【 0 1 7 6 】

当業者には明らかなように、本発明において使用される分岐ポリマーは、上記のテーマ  
での変化物を含む。例えば、上記のジ - リシン - P E G コンジュゲートは、3つのポリマ  
ーサブユニットを含みうるが、第3は上記の構造において未修飾でしめされている - ア  
ミンに結合されている。同様に、所望の方法でポリマー修飾部分で標識された3つもしく  
は4つのポリマーサブユニットで官能化されたトリ - リシンの使用は本発明の範囲内であ  
る。

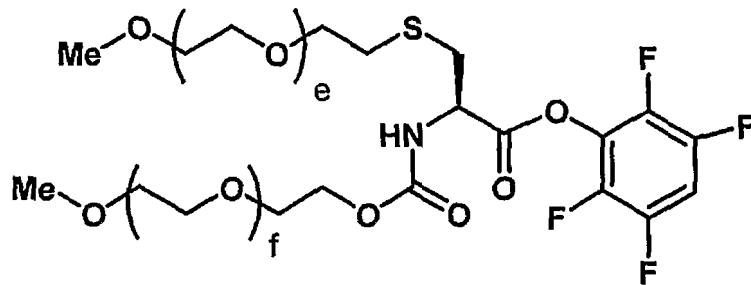
## 【 0 1 7 7 】

ポリマー修飾部分は、グリコシルコアとの反応のために活性化されうる。活性化種（例 30  
えば、炭酸塩および活性エステル）の代表的な構造は、

## 【化 5 4】



10



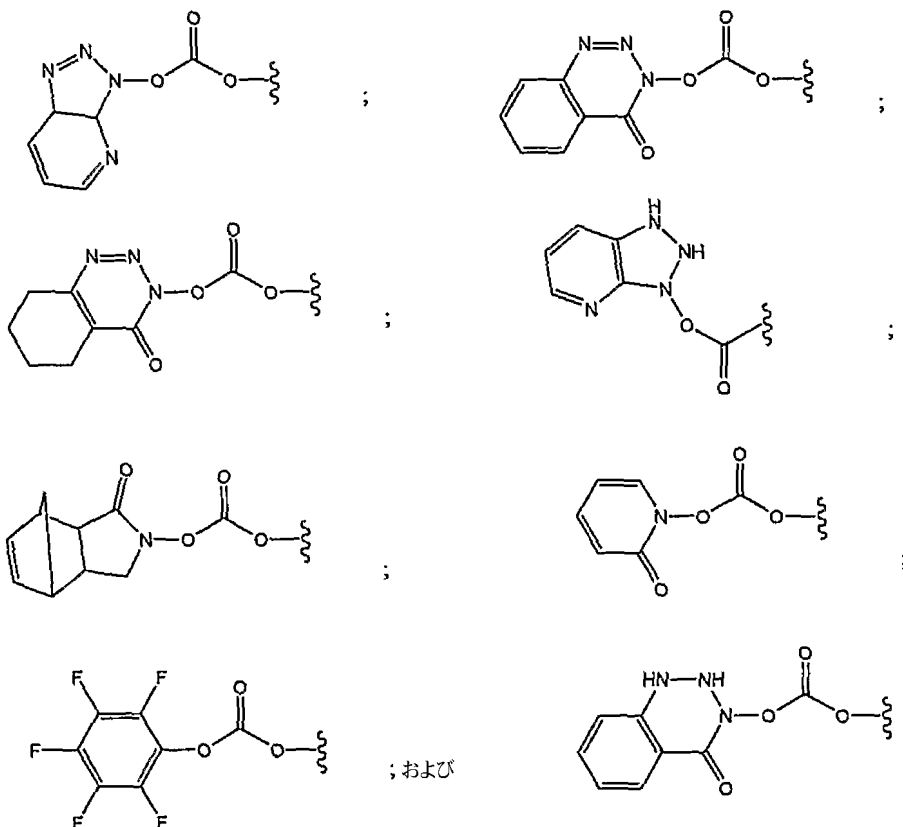
20

を含む。

## 【 0 1 7 8 】

本明細書に記載された化合物の調製において使用される線状および分岐 P E G を活性化するために適切な他の活性化、または脱離基は、

## 【化 5 5】



30

40

を含むがこれに限定されない。

50

これらおよび他の種で活性化されるPEG分子および活性化PEGを製造する方法は、国際公開第04/083259号パンフレットに記載されている。

【0179】

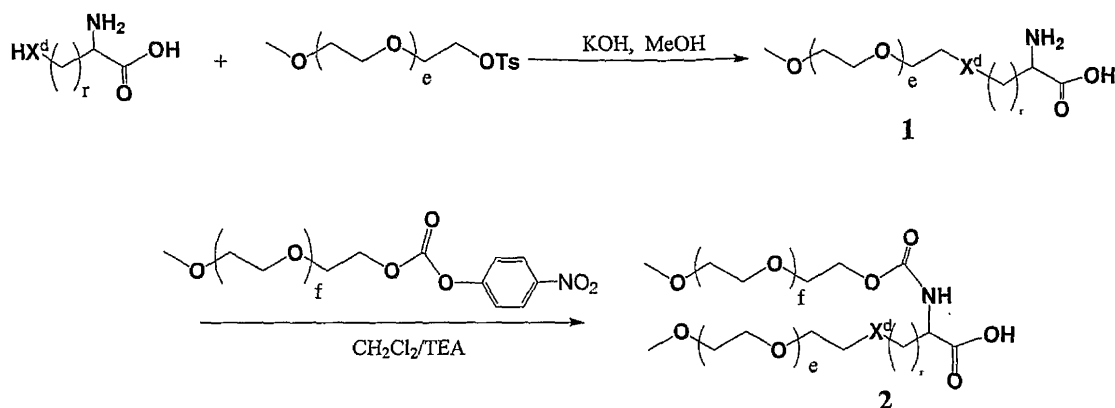
当業者は、上記の分岐ポリマーの1つもしくはそれ以上のm-PEG腕が、異なる末端、例えば、OH、COOH、NH<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-アルキル等を有するPEG部分によって置換されうること十分に理解するであろう。さらに、上記の構造は、アミノ酸側鎖の炭素原子と官能基との間にアルキルリンカーを挿入すること（または炭素原子を除去すること）によって容易に修飾される。したがって、「ホモ」誘導体および高いホモログ、および低いホモログが本発明において使用される分岐PEGのためのコアの範囲内である。

10

【0180】

本明細書に記載された分岐PEG種は、以下のスキーム

【化56】



20

[式中、X<sup>d</sup>はOまたはSであり、rは1～5の整数である。指数eおよびfは独立して選択される1～2500の整数である。代表的な実施形態において、これらの指数の一方または両方は、ポリマーが分子量において約10kD、15kD、または20kDであるように選択される]に記載されているものなどの方法によって容易に調製される。

30

【0181】

したがって、本スキームによれば、天然または非天然アミノ酸が、活性化m-PEG誘導体、この場合には、トシレートと接触し、側鎖ヘテロ原子X<sup>d</sup>をアルキル化することによって1を形成する。単機能化m-PEGアミノ酸は、反応性m-PEG誘導体によるN-アシル化条件を受け、それによって、分岐m-PEG 2をアセンブルする。当業者が十分に理解するように、トシレート脱離基は、適切な脱離基、例えば、ハロゲン、メシレート、トリフレート等で置換されうる。同様に、アミンをアシル化するために使用される反応炭酸塩は、活性エステル、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド等によって置換され、または酸は、ジシクロヘキシルカルボジイミド、カルボニルジイミダゾールなど脱水剤を使用してインサイチューで活性化されうる。

40

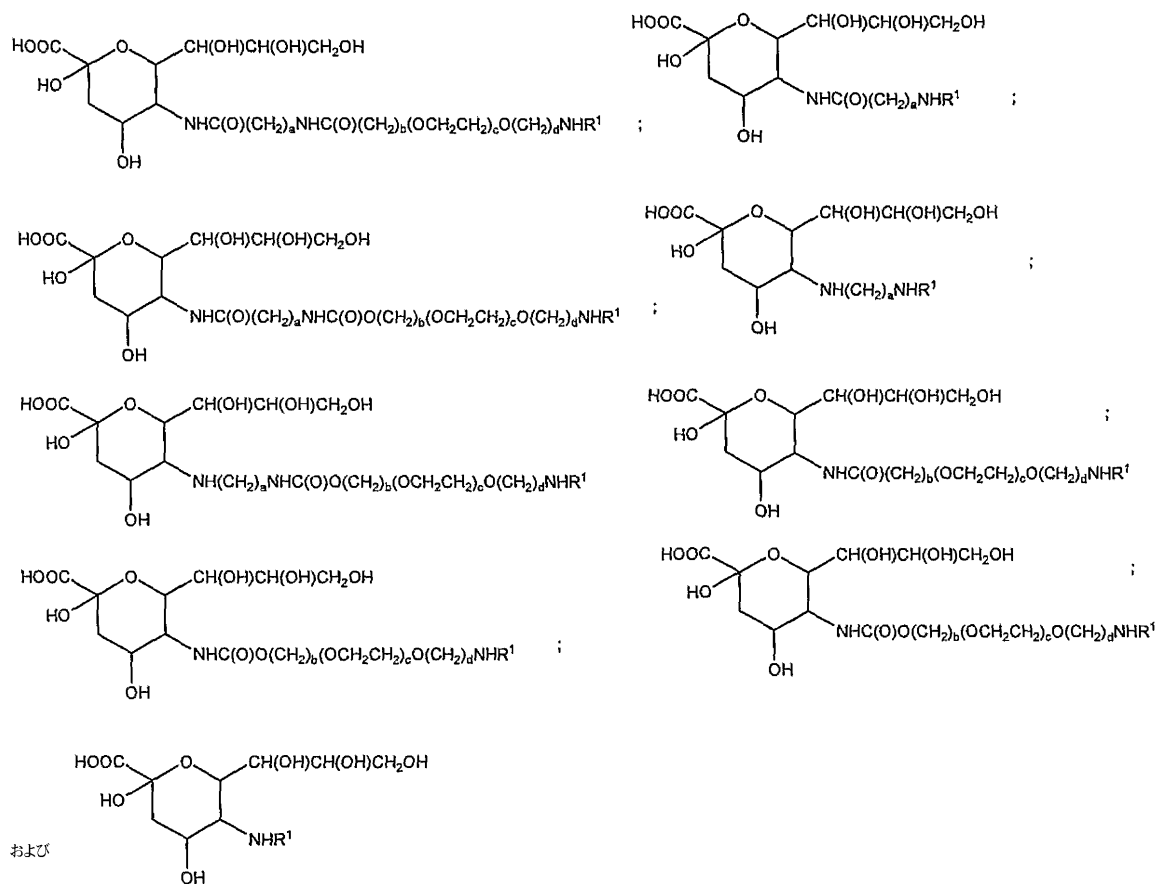
【0182】

他の代表的な実施形態において、尿素部分はアミドなどの基によって置換される。

【0183】

例示的实施形態において、修飾糖はシアル酸であり、本発明において使用される選択修飾糖化合物は次式を有する。

## 【化 5 7】



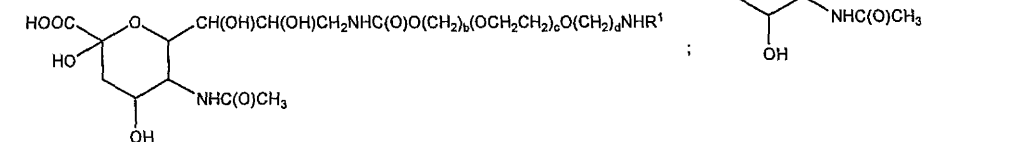
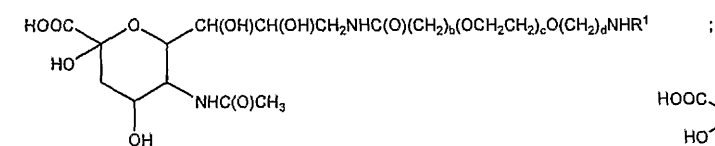
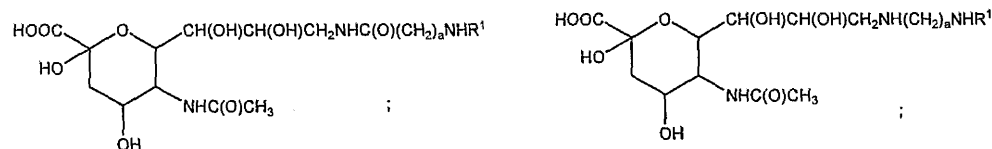
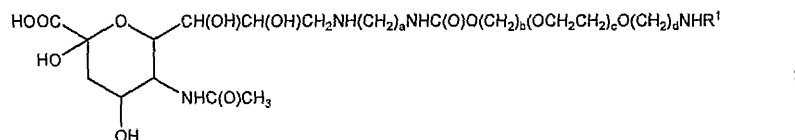
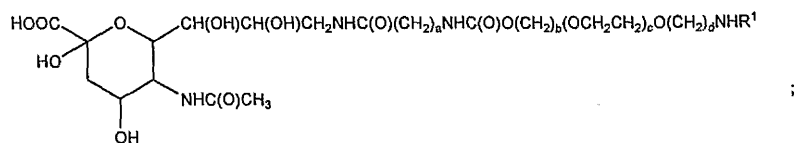
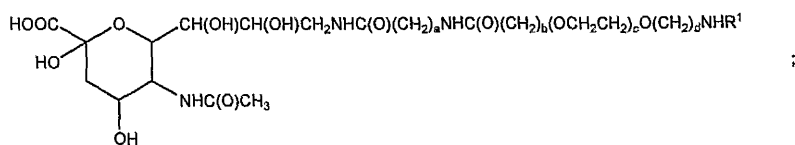
指数 a、b、および d は 0 ~ 20 の整数である。指数 c は 1 ~ 2500 の整数である。上記の構造物は R<sup>15</sup> の成分でありうる。

## 【0184】

別の例示的实施形態において、糖の 1 級ヒドロキシル部分が修飾基で官能化される。例えば、シアル酸の 9 - ヒドロキシルは対応するアミンに変換され、官能化され、本発明による化合物を提供しうる。本実施形態による式は以下を含む。

30

## 【化 5 8】



上記の構造物は  $R^{1-5}$  の成分でありうる。

## 【0185】

当業者が十分に理解するように、上記の代表的な化合物におけるシアル酸部分は、グルコサミン、ガラクトサミン、マンノサミン、そのN-アシル誘導体などを含むが、これらに限定されない他のいずれかのアミノ-サッカリドで置換されうる。

## 【0186】

本発明は、PEGを参照することにより前項で例示されているが、当業者が十分に理解するように、一連のポリマー修飾部分が本発明による化合物および方法に使用される。

## 【0187】

選択実施形態において、 $R^1$  または  $L-R^1$  は分岐PEG、例えば、上記の種の1つである。本実施形態による例示的修飾糖は、

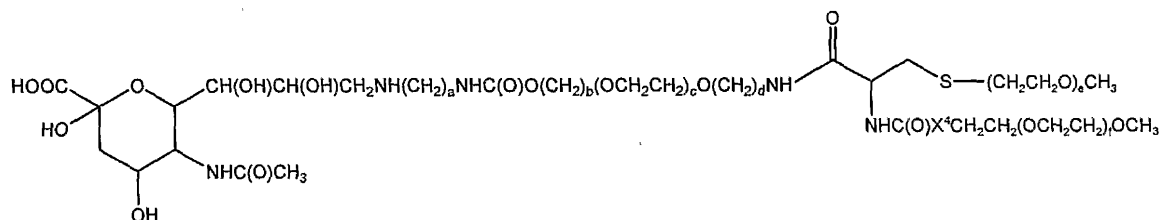
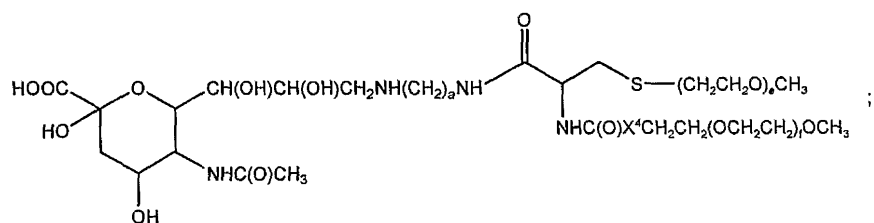
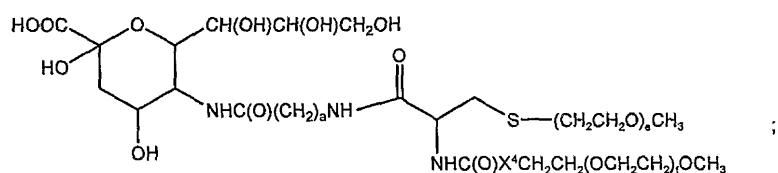
10

20

30

40

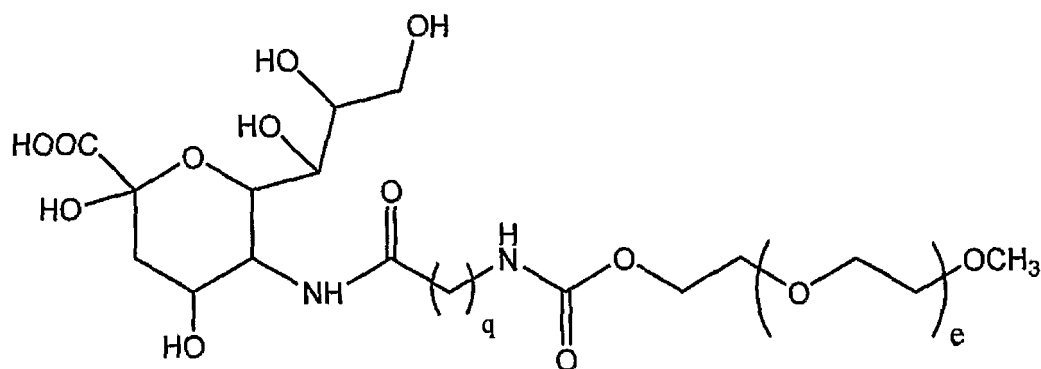


$$\begin{array}{c} \text{HOOC} \\ | \\ \text{HO} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ \text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH} \\ | \\ \text{NHC(O)}(\text{CH}_2)_a\text{NHC(O)}(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NH} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{CH} \end{array} \begin{array}{c} \text{S}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_e\text{CH}_3 \\ | \\ \text{NHC(O)}\text{X}^f\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_g\text{OCH}_3 \end{array}$$


[ 式中、 $X^4$  は、結合または 0 である ] を含む。上記の構造の各々において、アルキルアミンリンカー - (CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>NH - は存在または非存在でありうる。上記の構造物は R<sup>15</sup> / R<sup>15'</sup> の成分でありうる。

本明細書で論じように、本発明における脂溶のポリマー修飾シアル酸は線状構造でもありうる。したがって、本発明は、

【化 6 0】



[ 式中、q および e は上記の通りである ] などの構造物由来のシアル酸部分を含むコンジュゲートを提供する。

水不溶性ポリマー

上記のものと類似の別の実施形態において、修飾糖は、水溶性ポリマーではなく、水不溶性ポリマーを含む。本発明のコンジュゲートは、1つもしくはそれ以上の水不溶性ポリマーも含みうる。本発明の本実施形態は、それにより制御された方法で治療的ペプチドを送達するビヒクルとしてのコンジュゲートの使用によって説明される。ポリマー薬物送達系は当業界で周知である。例えば、ダン(Dunn)ら編、POLYMERIC DRUGS AND DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposiumシリーズ第469巻、米国化学会、Washington, D.C. 1991年。当業者は、実質的にすべての既知の薬物送達系が本発明のコンジュゲートに利用可能であることを十分に理解するであろう。

#### 【0190】

$R^1$ 、 $L-R^1$ 、 $R^{15}$ 、 $R^{15'}$ 、および他のラジカルの上記のモチーフは同等に水不溶性ポリマーに適用可能であり、これは当業者に容易に利用可能な化学反応を使用して制限なしに線状および分岐構造へ組込まれうる。

#### 【0191】

代表的な水不溶性ポリマーとしては、ポリホスファジン、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアミド、ポリ炭酸塩、ポリアルキレン、ポリアクリルアミド、ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハロゲン化物、ポリビニルピロリドン、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタン、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(エチルメタクリレート)、ポリ(ブチルメタクリレート)、ポリ(イソブチルメタクリレート)、ポリ(ヘキシルメタクリレート)、ポリ(イソデシルメタクリレート)、ポリ(ラウリルメタクリレート)、ポリ(フェニルメタクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)、ポリ(オクタデシルアクリレート) ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(エチレンテレフタレート)、ポリ(ビニルアセテート)、ポリビニルクロライド、ポリスチレン、ポリビニルピロリドン、プルロニック、およびポリビニルフェノール、およびそのコポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0192】

本発明のコンジュゲートにおいて使用される合成修飾天然ポリマーとしては、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、およびニトロセルロースが挙げられるが、これらに限定されない。広範のクラスの合成修飾天然ポリマーの特に好ましいメンバーとしては、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、セルロースアセテート、セルロースプロピオネート、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートフタレート、カルボキシメチルセルロース、セルローストリアセテート、硫酸セルロースナトリウム塩、およびアクリルおよびメタクリルエステルのポリマー、およびアルギン酸が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0193】

本明細書で論じられたこれらおよび他のポリマーは、シグマ・ケミカル社(Sigma Chemical Co.)(St. Louis、ミズーリ州(MO))、ポリサイエンス(Poly sciences)(Warrenton、ペンシルベニア州(PA))、アルドリッチ(Aldrich)(Milwaukee、ウィスコンシン州(WI))、フルカ(Fluka)(Ronkonkoma、ニューヨーク州(NY))、およびバイオラッド(BioRad)(Richmond、カリフォルニア州(CA))などの商業的供給源から容易に得られ、あるいは標準方法を使用してこれら供給元から得られるモノマーから合成されうる。

#### 【0194】

本発明のコンジュゲートにおいて使用される代表的な生体分解性ポリマーとしては、ポリラクチド、ポリグリコリド、およびそのコポリマー、ポリ(エチレンテレフタレート

10

20

30

40

50

）、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）、ポリ（ラクチド - c o - カプロラクトン）、ポリ（ラクチド - c o - グリコリド）、ポリ無水物、ポリオルトエステル、その混合物およびコポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。特に使用されるのは、コラーゲン、プルロニックなどを含むものなどゲルを形成する組成物である。

【 0 1 9 5 】

本発明において使用されるポリマーとしては、少なくともその構造の一部分内に生体吸収性分子を有する水溶性材料を含む「ハイブリッド」ポリマーが挙げられる。かかるポリマーの例が、ポリマー鎖当り生体吸収性部位、親水性部位、および複数の架橋可能官能基を有する水不溶性コポリマーを含むものである。

【 0 1 9 6 】

本発明において、「水不溶性材料」は、水または水含有環境下に実質的に不溶性である材料を含む。したがって、コポリマーの一定の部位または部分は親水性またはさらに水溶性でありうるが、ポリマー分子は、全体として、水中で実質的程度に溶解することはない。

【 0 1 9 7 】

本発明において、「生体吸収性分子」という語は、体によって正常な排泄経路により代謝され、または分解され、および吸収され、かつ／または除去されうる部位を含む。かかる代謝産物または分解生成物は、好ましくは、実質的に体に対して非毒性である。

【 0 1 9 8 】

生体吸収性部位は、コポリマー組成物が全体として水溶性が提供されない限り、疎水性または親水性でありうる。したがって、生体吸収性部位は、ポリマーが、全体として、水不溶性のままである選好に基づき選択される。したがって、相対的特性、すなわち、含まれる官能基の種類、および生体吸収性部位の相対的特性、および親水性部位は、有用な生体吸収性組成物が水不溶性のままであること確実にするために選択される。

【 0 1 9 9 】

代表的な吸収性ポリマーとしては、例えば、ポリ（ - ヒドロキシ - カルボン酸）／ポリ（オキシアルキレン、（コーン（C o h n）ら、米国特許第 4 , 8 2 6 , 9 4 5 号明細書）の合成製造された吸収性ブロックコポリマーが挙げられる。これらのコポリマーは架橋されず、水溶性であるため、体は分解ブロックコポリマー組成物を排泄することができる。ユーニス（Y o u n e s）ら、J B i o m e d . M a t e r . R e s . 2 1 : 1 3 0 1 - 1 3 1 6 頁（1987年）、およびコーン（C o h n）ら、J B i o m e d . M a t e r . R e s . 2 2 : 9 9 3 - 1 0 0 9 頁（1988年）を参照。

【 0 2 0 0 】

現在、好ましい生体吸収性ポリマーとしては、ポリ（エステル）、ポリ（ヒドロキシ酸）、ポリ（ラクトン）、ポリ（アミド）、ポリ（エステル - アミド）、ポリ（アミノ酸）、ポリ（無水物）、ポリ（オルトエステル）、ポリ（炭酸塩）、ポリ（ホスファジン）、ポリ（ホスホエステル）、ポリ（チオエステル）、ポリサッカリド、およびその混合物から選択される１つもしくはそれ以上の成分が挙げられる。さらにより好ましくは、生体吸収性ポリマーとしては、ポリ（ヒドロキシ）酸成分が挙げられる。ポリ（ヒドロキシ）酸のうち、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカプロ酸、ポリ酪酸、ポリ吉草酸、およびコポリマー、およびその混合物が好ましい。

【 0 2 0 1 】

インビボ吸収される（「生体吸収性」）断片の形成に加えて、本発明の方法において使用されるための好ましいポリマーコーティングが排泄可能および／または代謝可能な断片も形成しうる。

【 0 2 0 2 】

高次コポリマーも本発明において使用されうる。例えば、1984年3月20日に発行されたケーシー（C a s e y）ら、米国特許第 4 , 4 3 8 , 2 5 3 号明細書は、ポリ（グリコール酸）およびヒドロキシル末端ポリ（アルキレングリコール）のエステル交換から製造されたトリブロックコポリマーを開示している。かかる組成物は、吸収性モノフィラ

10

20

30

40

50

メント縫合糸として使用するために開示されている。かかる組成物の柔軟性は、テトラ - p - トリルオルト炭酸塩など芳香族炭酸塩のコポリマー構造物への組込みによって制御される。

#### 【0203】

乳酸および/またはグリコール酸に基づく他のポリマーも使用されうる。例えば、1993年4月13日に発行された、スピヌ(Spinu)、米国特許第5,202,413号明細書は、オリゴマージオールまたはジアミン残基のいずれかへのラクチドおよび/またはグリコリドの開環重合の後、ジイソシアネート、ジアシルクロライド、またはジクロロシランなど二官能性化合物による鎖延長によってポリラクチドおよび/またはポリグリコリドの連続的に順序化されたブロックを有する生体分解性マルチブロックコポリマーを開示している。

10

#### 【0204】

本発明において有用なコーティングの生体吸収性部位は、加水分解的および/または酵素的に開裂可能であるようにデザインされうる。本発明において、「加水分解的に開裂可能」は、コポリマー、特に生体吸収性部位が、水および水含有環境下に加水分解の影響を受けやすいことを指す。同様に、本明細書で使用される「酵素的に開裂可能」は、コポリマー、特に生体吸収性部位が、内因性または外因性酵素による開裂の影響を受けやすいことを指す。

#### 【0205】

体内に配置されると、親水性部位は排泄可能および/または代謝可能な断片へ加工されうる。したがって、親水性部位は、例えば、ポリエーテル、ポリアルキレンオキシド、ポリオール、ポリ(ビニルピロリジン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(アルキルオキサゾリン)、ポリサッカリド、炭水化物、ペプチド、タンパク質、およびコポリマー、およびその混合物を含みうる。さらに、親水性部位は、例えば、ポリ(アルキレン)オキシドでありうる。かかるポリ(アルキレン)オキシドは、例えば、ポリ(エチレン)オキシド、ポリ(プロピレン)オキシド、およびその混合物、およびコポリマーを含みうる。

20

#### 【0206】

ヒドロゲルの成分であるポリマーも本発明において有用である。ヒドロゲルは、比較的大量の水を吸収しうるポリマー材料である。化合物を形成するヒドロゲルの例としては、ポリアクリル酸、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリジン、ゼラチン、カラギナン、および他のポリサッカリド、ヒドロキシエチレンメタクリル酸(HEMA)のほか、その誘導体などが挙げられるが、これらに限定されない。安定し、生体分解性、かつ生体吸収性であるヒドロゲルが製造されうる。さらに、ヒドロゲル組成物は、これらの特性の1つもしくはそれ以上を示すサブユニットを含みうる。

30

#### 【0207】

その完全性が架橋結合により制御されうる生体適合性ヒドロゲル組成物が周知であり、本発明の方法において使用されるために現在、好ましい。例えば、1995年4月25日発行のハッベル(Hubbell)ら、米国特許第5,410,016号明細書、および1996年6月25日発行の同第5,529,914号明細書は、2つの加水分解的に不安定な伸長間に挟まれた水溶性の中心ブロック部分を有する架橋結合ブロックコポリマーである水溶性系を開示している。かかるコポリマーはさらに、光重合性アクリレート官能性で末端キャップされる。架橋結合されると、これらの系はヒドロゲルになる。かかるコポリマーの水溶性中心ブロックはポリ(エチレングリコール)を含みうるが、加水分解的に不安定な伸長は、ポリグリコール酸またはポリ乳酸などのポリ(-ヒドロキシ酸)でありうる。ソーニー(Sawhney)ら、Macromolecules 26:581-587頁(1993年)を参照。

40

#### 【0208】

別の好ましい実施形態において、ゲルは熱可逆性ゲルである。ブルロニック、コラーゲ

50

ン、ゼラチン、ヒアルロン酸、ポリサッカリド、ポリウレタンヒドロゲル、ポリウレタン-尿素ヒドロゲル、およびその組合せなどの成分を含む熱可逆性ゲルが現在、好ましい。

#### 【0209】

さらに別の代表的な実施形態において、本発明のコンジュゲートは、リボソームの成分を含む。リボソームは、例えば、エプシュタイン(Eppstein)ら、米国特許第4,522,811号明細書に記載されているような当業者に周知の方法に従って調製される。例えば、リボソーム製剤は、適切な脂質(ステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ステアロイルホスファチジルコリン、アラカドイルホスファチジルコリン、およびコレステロールなど)を次いで蒸発される無機溶媒中に溶解し、容器の表面上の乾燥脂質の薄膜の背後に脱離することによって調製される。次いで、活性化化合物またはその医薬的に許容される塩の水溶液を容器に導入する。次いで、容器を手で回転させ、容器の側面から脂質材料を取除き、脂質凝集体を分散させ、それによってリボソーム懸濁液を形成する。

10

#### 【0210】

上記の微小粒子および微小粒子を調製する方法は実施例によって示され、それらは本発明において使用される微小粒子の範囲を規定することが意図されていない。異なる方法によって加工された一連の微小粒子が、本発明において使用されることは当業者には明らかであろう。

#### 【0211】

水溶性ポリマーに関連した上記の構造的フォーマット、直鎖および分岐は一般に水不溶性ポリマーに対しても同じく適用可能である。したがって、例えば、システイン、セリン、グリシン、およびトリリシン分岐コアは、2つの水不溶性ポリマー部分で官能化される。これらの種を製造するために使用される方法は一般に、水溶性ポリマーを製造するために使用されるものときわめて類似している。

20

#### 【0212】

方法

上記のコンジュゲートに加えて、本発明は、これらおよび他のコンジュゲートを調製するための方法を提供する。さらに、本発明は、疾患を発症するリスクがある対象、または疾患を有する対象に本発明のコンジュゲートを投与することによって疾患状態を予防、治療、または改善する方法を提供する。

30

#### 【0213】

代表的な実施形態において、コンジュゲートは、ポリマー修飾部分とグリコシル化または未グリコシル化ペプチドとの間で形成される。ポリマーは、ペプチド(グリコシル残基)と修飾基(例えば、水溶性ポリマー)との間に挿入され、かつこれらに共有結合したグリコシル連結基によってペプチドにコンジュゲートされる。この方法は修飾糖および酵素、例えば、修飾糖を基質にコンジュゲートするグリコシルトランスフェラーゼを含有する混合物と接触させるステップを含む。反応は、修飾糖とペプチドとの間に共有結合を形成するのに適切な条件下に行われる。修飾糖の糖部分は、好ましくは、ヌクレオチド糖から選択される。

40

#### 【0214】

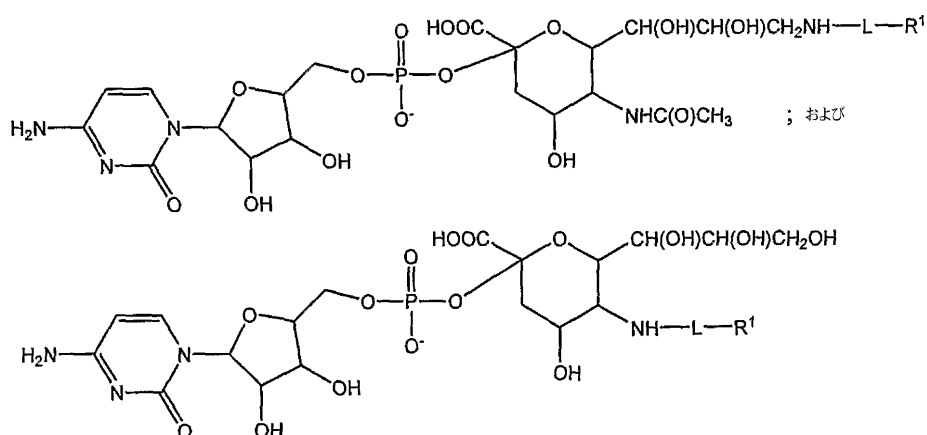
代表的な実施形態において、上記のものなどの修飾糖は、対応するヌクレオチド糖として活性化される。その修飾形態で本発明において使用される代表的な糖ヌクレオチドは、ヌクレオチド一、二、および三リン酸、またはその類似体を含む。好ましい実施形態において、修飾糖ヌクレオチドは、UDP-グリコシド、CMP-グリコシド、またはGDP-グリコシドから選択される。さらにより好ましくは、修飾糖ヌクレオチドの糖ヌクレオチド部分は、UDP-ガラクトース、UDP-ガラクトサミン、UDP-グルコース、UDP-グルコサミン、GDP-マンノース、GDP-フコース、CMP-シアル酸、またはCMP-NeuAcから選択される。代表的な実施形態において、リン酸ヌクレオチドはC-1に結合されている。

50

## 【 0 2 1 5 】

したがって、グリコシル部分がシアル酸である例示的实施形態において、本発明の方法は式

## 【 化 6 1 】



10

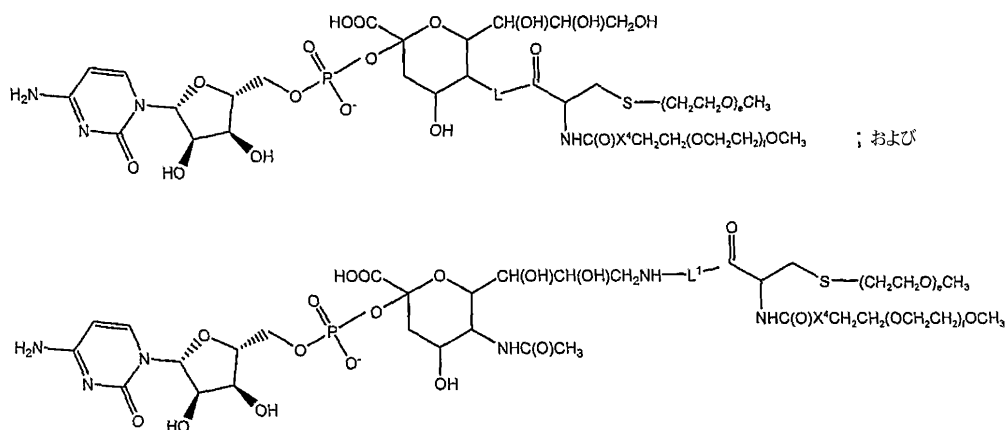
[ 式中、 $L - R^1$  は上記の通りであり、 $L^1 - R^1$  は修飾基に結合されたリンカーを表す。L のように、 $L^1$  による代表的なリンカー種は、結合、アルキル、またはヘテロアルキル部分を含む ] を有する化合物を使用する。

20

## 【 0 2 1 6 】

さらに、上記の通り、本発明は、直鎖または分岐のいずれかである水溶性ポリマーで修飾されるヌクレオチド糖の使用を提供する。例えば、下記の式

## 【 化 6 2 】



30

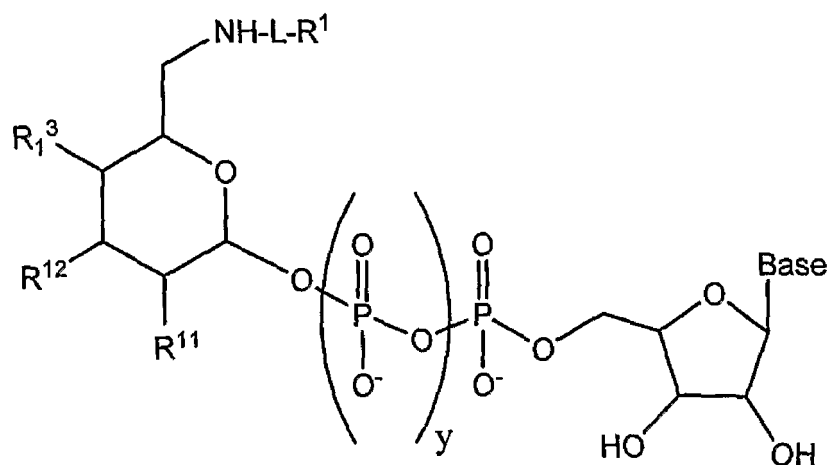
[ 式中、 $X^4$  は O または 結合である ] を有する化合物は本発明の範囲内のコンジュゲートを調製するために使用される。

40

## 【 0 2 1 7 】

本発明は、6 - 炭素位置で  $L - R^1$  で修飾された糖ヌクレオチドの使用をも提供する。本実施形態による代表的な種は、

【化 6 3】



10

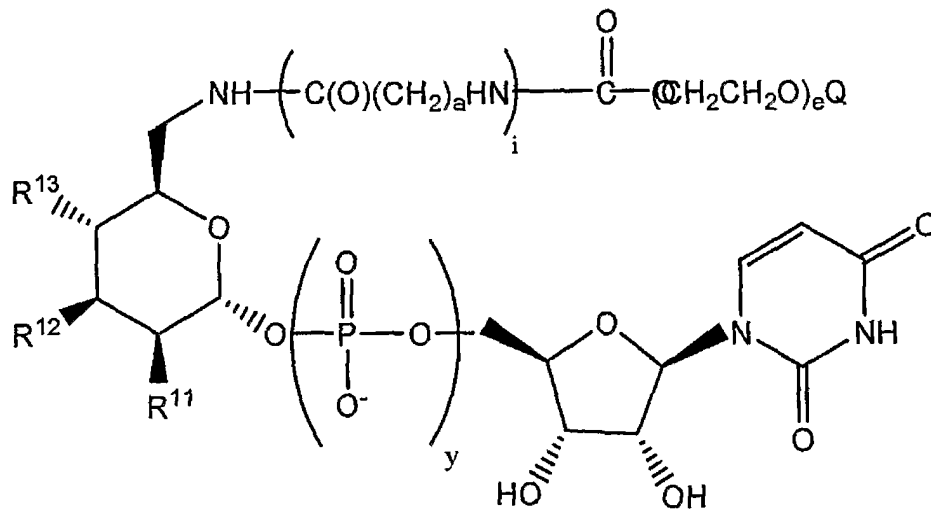
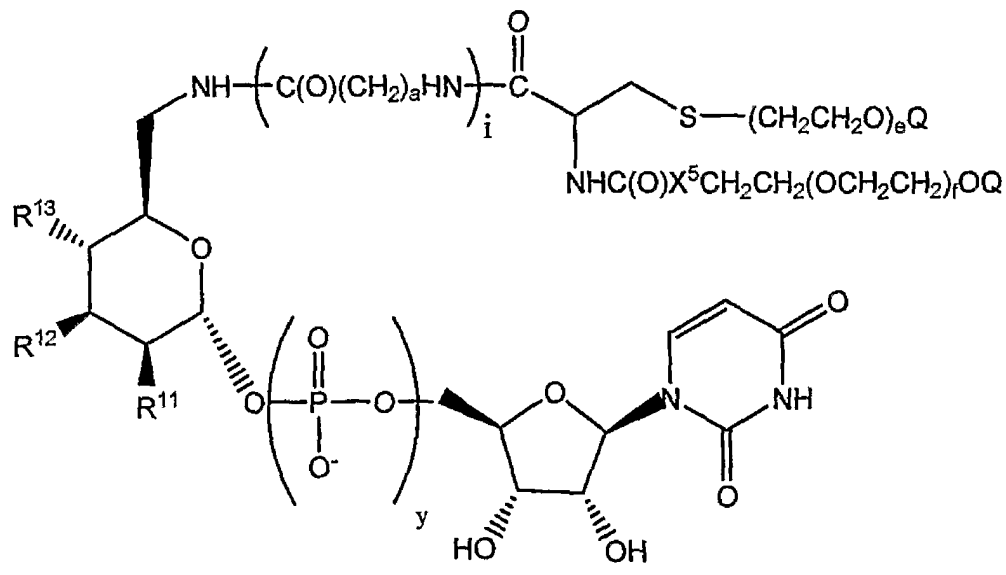
〔式中、R基、およびLは、上記の部分を表す。指数「y」は0、1、または2である〕を含む。代表的な実施形態において、LはNHとR<sup>1</sup>との間の結合である。塩基は核酸塩基である。

【0218】

20

6 - 位置での炭素が修飾される本発明において使用される代表的なヌクレオチド種は、GDPマンノースの立体化学反応、例えば、

## 【化 6 4】



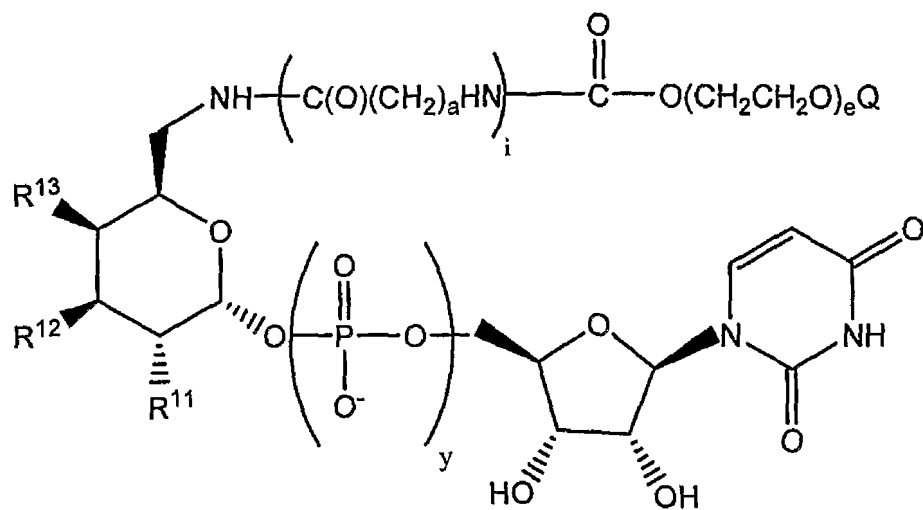
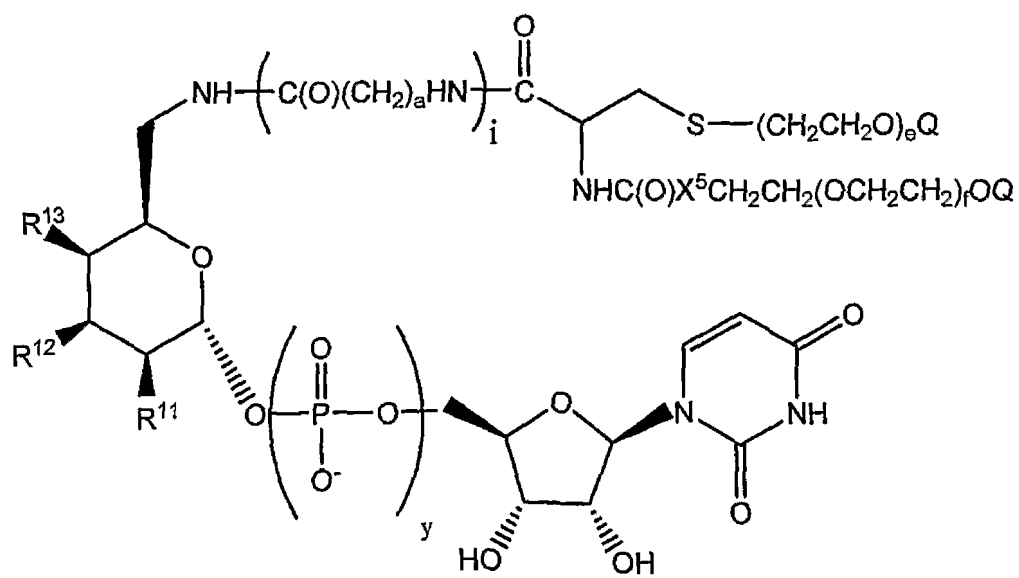
[ 式中、 $X^5$  は結合またはOである。指数  $i$  は0または1を表す。指数  $a$  は1～20の整数である。指数  $e$  および  $f$  は独立して1～2500の整数を表す。Qは、上記の通り、Hまたは置換もしくは非置換  $C_1 - C_6$  アルキルである ] を有する種を含む。当業者は十分に理解するように、SがOで置換されているセリン誘導体もこの一般モチーフの範囲内にある。

## 【 0 2 1 9 】

さらに代表的な実施形態において、本発明は、修飾糖がUDPガラクトースの立体化学反応に基づくコンジュゲートを提供する。本発明において使用される代表的なヌクレオチド糖は構造



【化 6 5】



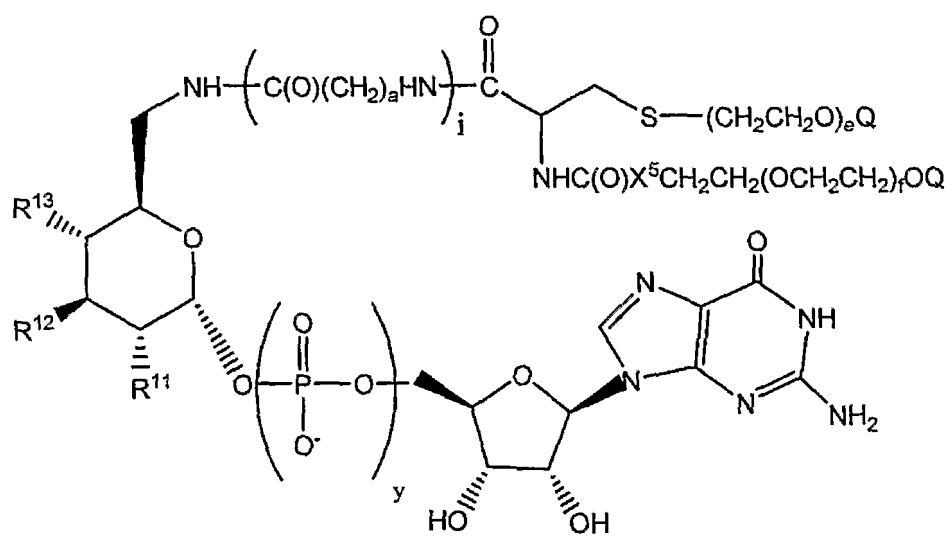
を有する。

【 0 2 2 0 】

別の代表的な実施形態において、ヌクレオチド糖はグルコースの立体化学に基づく。本実施形態による代表的な種は式

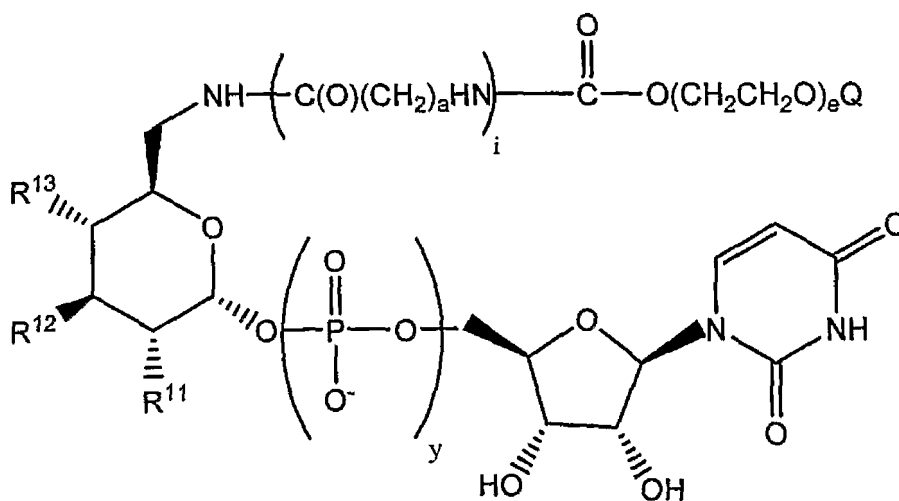
30

## 【化 6 6】



10

; および



20

30

を有する。

## 【 0 2 2 1】

一般に、糖部分または糖部分 - リンカーカセットおよび PEG または PEG - リンカーカセット基は、連結方法によって一般的に新しい有機官能基または未反応種に変換されている反応基の使用により連結されている。糖反応官能基は、糖部分の任意の位置に配置されている。本発明の実施において有用な反応基および反応クラスは一般にバイオコンジュゲート化学の当業界で公知であるものである。反応糖部分で利用可能な反応の現在好ましいのは、比較的温和な条件下に行われるものである。これらには、求核置換反応（例えば、アミンおよびアルコールのアシルハロゲン化物、活性エステルとの反応）、求電子置換反応（例えば、エナミン反応）、および炭素 - 炭素および炭素 - ヘテロ原子多重結合へ付加（例えば、マイケル反応、ディールス・アルダー付加）が含まれるが、これらに限定されない。これらおよび他の有用な反応は、例えば、マーチ (March)、ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY、第 3 版、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ (John Wiley & Sons)、New York、1985 年、ヘルマンソン (Hermanson)、BIOCONJUGATE TECHNIQUES、アカデミック・プレス (Academic Press)、San Diego、1996 年、およびフィーニー (Feeney) ら、MODIFICATION OF PROTEINS、Advances in Chemistry Series、第 198 巻、米

40

50

国化学会、Washington, D.C.、1982年において議論されている。

#### 【0222】

糖核または修飾基から懸垂する有用な反応官能基としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない。

(a) N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、N - ヒドロキシベンズトリアゾールエステル、酸ハロゲン化物、アシルイミダゾール、チオエステル、p - ニトロフェニルエステル、アルキル、アルケニル、アルキニル、および芳香族エステルを含むが、これらに限定されないカルボキシル基、およびそのさまざまな誘導体、

(b) 例えば、エステル、エーテル、アルデヒド等に変換されうるヒドロキシル基、

(c) ハロゲン化物が後に、例えば、アミン、カルボン酸アニオン、チオールアニオン、カルバニオン、またはアルコキシドイオンなどの求核基で置換され、それによって結果としてハロゲン原子の官能基で新しい基の共有結合が生じるハロアルキル基、

(d) 例えば、マレイミド基など、ディールス・アルダー反応に参与できる求ジエン基、

(e) その後の誘導体化が、例えば、イミン、ヒドラゾン、セミカルバゾン、またはオキシムなどカルボニル誘導体によって、またはグリニユール付加もしくはアルキルリチウム付加などの機序によって可能であるアルデヒドまたはケトン基、

(f) 例えば、スルホンアミドを形成するその後のアミンとの反応のためのスルホニルハロゲン化物基、

(g) 例えば、ジスルフィドに変換され、またはアシルハロゲン化物と反応されうるチオール基、

(h) 例えば、アシル化、アルキル化、または酸化されうるアミンまたはスルフヒドリル基、

(i) 例えば、シクル付加、アシル化、マイケル付加等を受けうるアルケン、および

(j) 例えば、アミンおよびヒドロキシル化合物と反応しうるエポキシド。

#### 【0223】

反応官能基は、それらが反応糖核または修飾基をアセンブルするために必要な反応に参与することがなく、またはこれを阻害することがないように選択される。あるいは、反応官能基は保護基の存在によって反応に参与することから保護されうる。当業者は、それが選ばれた一連の反応条件に干渉しないように特定の官能基を保護する方法を理解している。有用な保護基については、例えば、グリーン (Greene) ら、PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ (John Wiley & Sons)、New York、1991年を参照。

#### 【0224】

次の議論において、本発明の実施において有用な修飾糖の多くの特定の実施例が記載されている。代表的な実施形態において、シアル酸誘導体は、修飾基が結合される糖核として使用される。シアル酸誘導体への議論の焦点が説明の明確さに限定され、本発明の範囲を制限すると考えるべきではない。当業者は、さまざまな他の糖部分が、一例としてシアル酸の使用が記載されているものと類似の方法で活性化および誘導体化されることを十分に理解するであろう。例えば、当技術分野で承認されている方法によって容易に修飾される糖物質の2~3の例を挙げると、修飾ガラクトース、グルコース、N - アセチルガラクトサミンおよびフコースについて多数の方法が利用可能である。例えば、エルハラビ (Elhalabi) ら、Curr. Med. Chem. 6: 93 (1999年)、およびシェーファー (Schaefer) ら、J. Org. Chem. 65: 24 (2000年)を参照。

#### 【0225】

代表的な実施形態において、修飾糖は6 - アミノ - N - アセチル - グリコシル部分に基づく。N - アセチルガラクトサミンについて図5に示されているように、6 - アミノ糖部分は標準方法によって容易に調製される。

## 【 0 2 2 6 】

上記のスキームにおいて、指数  $n$  は 1 ~ 2 5 0 0 の整数を表す。代表的な実施形態において、この指数は、ポリマーが分子量において約 1 0 k D、1 5 k D、または 2 0 k D であるように選択される。記号「A」は活性化基、例えば、ハロ、活性化エステル成分（例えば、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル）、炭素酸成分（例えば、p - ニトロフェニル炭酸塩）などを表す。当業者は、他の P E G - アミドヌクレオチド糖がこれや類似の方法によって容易に調製されることを十分に理解する。

## 【 0 2 2 7 】

受容体ペプチドは一般的にデノボ合成され、または原核細胞（例えば、大腸菌（E . c o l i）などの細菌細胞）または哺乳類、酵母、昆虫、真菌、または植物細胞など真核細胞において組換え発現される。ペプチドは完全長タンパク質または断片のいずれかである。さらに、ペプチドは、野生型または変異ペプチドでありうる。代表的な実施形態において、ペプチドは、1 つもしくはそれ以上の N または O 連結グリコシル化部位をペプチド配列に付加する変異を含む。

## 【 0 2 2 8 】

本発明の方法は、組換え製造される不完全にグリコシル化したペプチドの修飾も提供する。多くの組換え製造された糖タンパク質は不完全にグリコシル化され、望ましくない特性、例えば、R E S によって認識される免疫原性を有しうる炭水化物残基を露出する。本発明の方法における修飾糖を使用することにより、ペプチドは、例えば、水溶性ポリマー、治療的薬剤、または同様のもので同時にさらにグリコシル化および誘導体化されうる。修飾糖の糖部分は、完全にグリコシル化されたペプチドにおける受容体、または所望の特性を有する別の糖部分に適切にコンジュゲートされる残基でありうる。

## 【 0 2 2 9 】

当業者は、本発明が、すべての供給源の実質的にすべてのペプチドまたは糖ペプチドを使用することにより実施されうる。本発明はそれにより実施されうる代表的ペプチドは、国際公開第 0 3 / 0 3 1 4 6 4 号パンフレット、および本明細書に記載されている文献に記載されている。

## 【 0 2 3 0 】

本発明の方法によって修飾されるペプチドは合成され、もしくは野生型ペプチドであり、またはそれらは、部位特異的突然変異生成など当業界で周知の方法によって製造される変異化ペプチドでありうる。ペプチドのグリコシル化は一般的に N 連結または O 連結のいずれかである。代表的な N リンケージはアスパラギン残基の側鎖との修飾糖の結合である。トリペプチド配列アスパラギン - X - セリンおよびアスパラギン - X - トレオニンは、ここで X はプロリン以外のアミノ酸であり、アスパラギン側鎖との炭水化物部分の酵素結合の標識配列である。したがって、ポリペプチドカセットにおけるこれらトリペプチド配列のいずれかにおける存在は、グリコシル化部位の可能性をもたらす。O 連結グリコシル化は、1 つの糖（例えば、N - アセチルガラクトサミン、ガラクトース、マンノース、G l c N A c、グルコース、フコース、キシロース）のヒドロキシアミノ酸、好ましくは、セリンまたはトレオニンのヒドロキシ側鎖との結合を指すが、異常なまたは非天然アミノ酸、例えば、5 - ヒドロキシプロリンまたは 5 - ヒドロキシリシンも使用されうる。

## 【 0 2 3 1 】

さらに、ペプチドに加えて、本発明の方法は他の生物構造物（例えば、糖脂質、脂質、スフィンゴイド、セラミド、グリコシル化部位を含有する全細胞など）で実施されうる。

## 【 0 2 3 2 】

グリコシル化部位のペプチドまたは他の構造物への付加は、それが 1 つもしくはそれ以上のグリコシル化部位を含有するようにアミノ酸配列を変更することによって便利に行われる。付加は、- O H 基、好ましくは、セリンまたはトレオニン残基を示す 1 つもしくはそれ以上の種のペプチドの配列内の（O 連結グリコシル化部位に対して）組込みによっても行われうる。付加は、ペプチドの突然変異または完全化学合成によって行われうる。ペプチドアミノ酸配列は、好ましくは、D N A レベルでの変化により、詳しくは、所望のア

10

20

30

40

50

ミノ酸へ翻訳するコドンが生成されるように所定の塩基でペプチドを符号化するDNAを突然変異させることによって変更される。DNA突然変異は、好ましくは、当業界で周知の方法を使用することによって行われる。

【0233】

代表的な実施形態において、グリコシル化部位は、ポリヌクレオチドをシャフリングすることによって付加される。候補のペプチドを符号化するポリヌクレオチドは、DNAシャフリングプロトコルで調節されうる。DNAシャフリングは、関連遺伝子のプールのランダム断片化の後、ポリメラーゼ連鎖反応法による断片の再アセンブリによって行われる再帰的組換えおよび突然変異の方法である。例えば、ステマー (Stemmer)、Proc. Natl. Acad. Set. USA 91: 10747 - 10751 頁 (1994)、ステマー (Stemmer)、Nature 370: 389 - 391 頁 (1994)、および米国特許第5,605,793号明細書、同第5,837,458号明細書、同第5,830,721号明細書、および同第5,811,238号明細書を参照。

10

【0234】

本発明がそれにより実施されうる代表的なペプチド、グリコシル部位を付加または除去、およびグリコシル構造または基礎構造の付加および除去の方法は、国際公開第03/031464号パンフレットおよび関連米国およびPCT出願に詳細に記載されている。

【0235】

本発明は、1つもしくはそれ以上の選択グリコシル残基をペプチドに付加（またはペプチドから除去）するステップも活用し、その後修飾糖がペプチドの選択グリコシル残基の少なくとも1つにコンジュゲートされる。本実施形態は、例えば、ペプチドに存在しないか、または所望の量で存在しない選択グリコシル残基に修飾糖をコンジュゲートすることが望ましい場合に有用である。したがって、修飾糖をペプチドに結合する前に、選択されたグリコシル残基は酵素または化学結合によってペプチドにコンジュゲートされる。別の実施形態において、糖ペプチドのグリコシル化パターンは、糖ペプチドからの炭水化物残基の除去によって修飾糖のコンジュゲーション前に変更される。例えば、国際公開第98/31826号パンフレットを参照。

20

【0236】

糖ペプチドに存在する炭水化物の付加または除去は化学的または酵素的に行われる。代表的な化学的脱グリコシル化は、ポリペプチド変異形の化合物トリフルオロメタンスルホン酸、または同等の化合物への曝露によってもたらされる。この処置の結果、連結糖 (N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン) を除きほとんど、またはすべての糖の開裂が生じるが、ペプチドを無傷のままにする。化学的脱グリコシル化は、ハキムジン (Hakimuddin) ら、Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 頁 (1987年) およびエッジ (Edge) ら、Anal. Biochem. 118: 131 頁 (1981年) によって記載されている。ポリペプチド変異形における炭水化物部分の酵素的開裂は、トタクラ (Tottakura) ら、Meth. Enzymol. 138: 350 頁 (1987年) によって記載されている通りさまざまなエンド- およびエキソグリコシダーゼの使用によって行われうる。

30

【0237】

代表的な実施形態において、ペプチドは、ペプチド上で糖コンジュゲーションまたは再構築ステップを行う前にノイラミダーゼで基本的に完全に脱シリアル化される。糖コンジュゲーションまたは再構築ステップ後、ペプチドは、場合により、シアリルトランスフェラーゼを使用して再シアリル化される。代表的な実施形態において、再シアリル化は基本的にシリアル受容体の集団における各々 (例えば、>80%、好ましくは、85%以上、90%以上、好ましくは、95%以上、かつより好ましくは、96%、97%、98%、または99%以上) 末端のサッカリール受容体で起こる。好ましい実施形態において、サッカリドは実質的に均一のシアリル化パターン (すなわち、実質的に均一のグリコシル化パターン) を有する。

40

【0238】

50

グリコシル部分の化学的付加は、当技術分野で承認されている方法によって行われる。糖部分の酵素的付加は、好ましくは、本明細書に記載の方法の修飾を使用し、本発明において使用される修飾糖の天然グリコシル単位を置換することによって行われる。糖部分を付加する他の方法は、米国特許第5,876,980号明細書、同第6,030,815号明細書、同第5,728,554号明細書、および同第5,922,577号明細書に開示されている。

#### 【0239】

選択グリコシル残基の代表的な結合点としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない。すなわち、(a) N連結グリコシル化のコンセンサス部位、およびO連結グリコシル化の部位、(b) グリコシルトランスフェラーゼの受容体である末端のグリコシル部分、(c) アルギニン、アスパラギン、およびヒスチジン、(d) 遊離カルボキシル基、(e) システインのものなど遊離スルフヒドリル基、(f) セリン、トレオニン、またはヒドロキシプロリンのものなど遊離ヒドロキシル基、(g) フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンのものなど芳香族残基、または(h) グルタミンのアミド基。本発明において使用される代表的な方法は、1987年9月11日発行の国際公開第87/05330号パンフレット、およびアプリン(Aplin)とリストン(Wriston)、CRC CRIT. REV. BIOCHEM.、259-306頁(1981年)に記載されている。

#### 【0240】

1つの実施形態において、本発明は、2つもしくはそれ以上のペプチドを、連結基を通じて連結するための方法を提供する。連結基は有用な構造であり、直鎖および分岐鎖構造から選択されうる。好ましくは、ペプチドの結合したリンカーの各々の末端は、修飾糖(すなわち、新生無傷グリコシル連結基)を含む。

#### 【0241】

本発明の代表的な方法において、2つのペプチドは、ポリマーを含むリンカー(例えば、PEGリンカー)によって連結されている。構成物は、上記の図に記載されている一般構造に一致する。本明細書に記載されている通り、本発明の構成物は2つの無傷グリコシル連結基(すなわち、 $s + t = 1$ )を含む。2つのグリコシル基を含むPEGリンカーへの焦点は、明確さのためであり、本発明の本実施形態において使用されるリンカー腕の同一性の制限と解釈すべきではない。

#### 【0242】

したがって、PEG部分は第1のグリコシル単位により第1の末端で、および第2のグリコシル単位により第2の末端で官能化される。第1および第2のグリコシル単位は、好ましくは、異なるトランスフェラーゼの基質であり、それぞれ、第1および第2のペプチドの第1および第2のグリコシル単位との直交の結合を可能にする。実際には、(グリコシル)<sup>1</sup> - PEG - (グリコシル)<sup>2</sup> リンカーは、第1のグリコシル単位が基質である第1のペプチドおよび第1のトランスフェラーゼと接触し、それによって(ペプチド)<sup>1</sup> - (グリコシル)<sup>1</sup> - PEG - (グリコシル)<sup>2</sup> を形成する。次いで、トランスフェラーゼおよび/または未反応ペプチドは、場合により、反応混合物から除去される。第2のグリコシル単位が基質である第2のペプチドおよび第2のトランスフェラーゼは、(ペプチド)<sup>1</sup> - (グリコシル)<sup>1</sup> - PEG - (グリコシル)<sup>2</sup> コンジュゲートに付加され、(ペプチド)<sup>1</sup> - (グリコシル)<sup>1</sup> - PEG - (グリコシル)<sup>2</sup> - (ペプチド)<sup>2</sup> を形成し、グリコシル残基の少なくとも1つは直接または間接のいずれかのO連結である。当業者は、上記の方法が、例えば、分岐PEG、デンドリマー、ポリ(アミノ酸)、ポリサッカリド、または同様のものを使用することによって、3つ以上のペプチド間のコンジュゲートの形成にも提供可能であることを十分に理解するであろう。

#### 【0243】

代表的な実施形態において、本発明の方法によって修飾されるペプチドは、哺乳類細胞(例えば、CHO細胞)またはトランスジェニック動物において生成される糖ペプチドであり、したがって、Nおよび/またはO連結オリゴ糖鎖を含有し、これらは不完全にシア

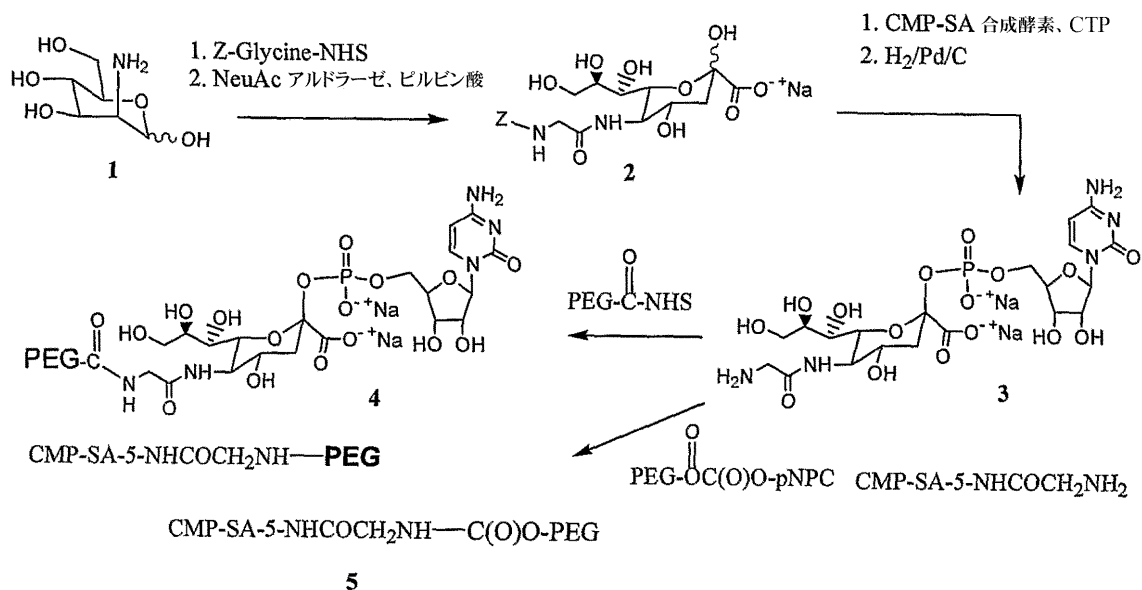
リル化される。シアル酸を欠き、かつ末端のガラクトース残基を含有する糖ペプチドのオリゴ糖鎖は、PEG化、PPG化され、または修飾シアル酸で修飾されうる。

#### 【0244】

スキーム1において、アミノグリコシド1は、保護アミノ酸（例えば、グリシン）誘導体の活性エステルで処理され、糖アミノ酸残基を対応する保護アミノ酸アミド付加化合物へ変換する。この付加化合物はアルドラーゼで処置され、 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸塩2を形成する。化合物2は、CMP-SA合成酵素の作用の後、CMP誘導体の触媒水素化によって対応するCMP誘導体に変換され、化合物3を生成する。グリシン付加化合物の形成によって導入されるアミンは、化合物3を活性化PEGまたはPPG誘導体（例えば、PEG-C(O)NHS、PEG-OC(O)O-p-ニトロフェニル）と反応させることによってPEG結合の位置として使用され、それぞれ、4または5などの種を生成する。

#### 【化67】

スキーム1



#### 【0245】

修飾糖のペプチドへのコンジュゲーション

PEG修飾糖は、コンジュゲーションを媒介する適切な酵素を使用してグリコシル化または未グリコシル化ペプチドへコンジュゲートされる。好ましくは、修飾ドナー糖、酵素、および受容体ペプチドの濃度は、受容体が消費されるまでグリコシル化が継続するように選択される。以下で議論される考慮は、シアリルトランスフェラーゼとの関連で記載されているが、一般に他のグリコシルトランスフェラーゼ反応にも適用可能である。

#### 【0246】

所望のオリゴ糖構造を合成するグリコシルトランスフェラーゼを使用する多くの方法が周知であり、一般に本発明に適用可能である。代表的な方法は、例えば、国際公開第96/32491号パンフレット、イトウ (Itou) ら、Pure Appl. Chem. 65: 753頁 (1993年)、米国特許第5,352,670号明細書、同第5,374,541号明細書、同第5,545,553号明細書、共同所有の米国特許第6,399,336号明細書および同第6,440,703号明細書、および共同所有の公開PCT出願、国際公開第03/031464号パンフレット、国際公開第04/033651号パンフレット、国際公開第04/099231号パンフレットに記載されているが、これらは参照により本明細書で援用される。

#### 【0247】

本発明は、単ーグリコシルトランスフェラーゼまたはグリコシルトランスフェラーゼの組合せを使用して実施される。例えば、シアリルトランスフェラーゼとガラクトシルトランスフェラーゼの組合せが使用されうる。2つ以上の酵素を使用する実施形態においては、酵素および基質は、好ましくは、初期反応混合物において混合され、または第2の酵素反応の酵素および試薬は、第1の酵素反応が完了またはほぼ完了すると反応培地に添加される。単一容器中で順に2つの酵素反応を行うことによって、全体的収率は、中間種が単離される方法を超えて改善される。さらに、余分な溶媒および副産物の清掃および除去が削減される。

【0248】

好ましい実施形態において、第1および第2の酵素の各々はグリコシルトランスフェラーゼである。別の好ましい実施形態において、1つの酵素はエンドグリコシダーゼである。追加の好ましい実施形態において、3つ以上の酵素が使用され、本発明の修飾糖タンパク質をアセンブリする。酵素は、ペプチドへの修飾糖の付加の前後いずれかの時点でペプチド上のサッカリド構造を変更するために使用される。

【0249】

別の実施形態において、この方法は1つもしくはそれ以上のエキソまたはエンドグリコシダーゼを使用する。グリコシダーゼは一般的に、遺伝子操作され、それらを破壊するよりもグリコシル結合を形成する突然変異体である。突然変異グリカナーゼは一般的に活性部位酸性アミノ酸残基のアミノ酸残基の置換を含む。例えば、エンドグリカナーゼがエンドHである場合、置換活性部位残基は一般的に位置130でAsp、位置132でGluまたはその組合せとなる。アミノ酸は一般にセリン、アラニン、アスパラギン、またはグルタミンで置換される。

【0250】

変異酵素は、通常、エンドグリカナーゼ加水分解ステップの逆反応と類似である合成ステップによって反応を触媒する。これらの実施形態において、グリコシルドナー分子（例えば、所望のオリゴ-またはモノサッカリド構造）は脱離基を含有し、反応はドナー分子のタンパク質上のGlcNAc残基への添加により継続する。例えば、脱離基はフッ化物などのハロゲンでありうる。他の実施形態において、脱離基はAsn、またはAsnペプチド部分である。別の実施形態において、グリコシルドナー分子上のGlcNAc残基は修飾される。例えば、GlcNAc残基は1,2オキサゾリン部分を含んで成りうる。

【0251】

好ましい実施形態において、本発明のコンジュゲートを生成するために使用される酵素の各々は触媒量で存在する。特定の酵素の触媒量が酵素の基質の濃度のほか、温度、時間、およびpH値など反応条件によって変動する。予め選択された基質濃度および反応条件下の所定の酵素の触媒量を決定する手段は当業者に公知である。

【0252】

上記の方法が行われる温度は氷点下のすぐ上から最も感受性の酵素が変性する温度までの範囲でありうる。好ましい温度範囲は、約0 ~ 約55、かつより好ましくは、約20 ~ 37である。別の代表的な実施形態において、本方法の1つもしくはそれ以上の成分は、好熱性酵素を使用する高温で行われる。

【0253】

反応混合物は、受容体はグリコシル化されるのに十分な時間にわたって維持され、それによって所望のコンジュゲートを形成する。コンジュゲートの一部はしばしば数時間後に検出されうるが、回収可能な量が通常、24時間以内に得られる。当業者は、反応速度が、選択される系に対して最適化される多くの変動要因（例えば、酵素濃度、ドナー濃度、受容体濃度、温度、溶媒容積）によって左右されることを理解する。

【0254】

本発明は、修飾ペプチドの工業規模の製造をも提供する。本明細書で使用される工業規模は一般に少なくとも1グラムの完成した精製コンジュゲートをもたらす。

【0255】



次の議論において、本発明は、修飾シアル酸部分のグリコシル化ペプチドとのコンジュゲーションによって例示される。代表的な修飾シアル酸はPEGで標識される。次の議論のPEG修飾シアル酸およびグリコシル化ペプチドの使用への焦点は説明の明確さのためであり、本発明がこれら2つのパートナーのコンジュゲーションに限定されることを意味することは意図されていない。当業者は、議論が一般にシアル酸以外の修飾グリコシル部分の付加にも適用可能であることを理解する。さらに、議論は同等に他のPEG部分、治療的部分、および生体分子を含むPEG以外の薬剤とともにグリコシル単位の修飾に適用可能である。

#### 【0256】

酵素方法をペプチドまたは糖ペプチドへのPEG化またはPPG化炭水化物の選択的導入のために使用されうる。この方法ではPEG、PPG、またはマスクした反応官能基を含有する修飾糖が使用され、適切なグリコシルトランスフェラーゼまたはグリコシターゼと混合される。所望炭水化物リンケージを作るグリコシルトランスフェラーゼを選択し、ドナー基質として修飾糖を使用することによって、PEGまたはPPGは、ペプチドに付加されているペプチド骨格、糖ペプチドの既存の残基、または糖残基へ直接、導入されうる。

#### 【0257】

代表的な実施形態において、シアリルトランスフェラーゼの受容体が、天然起源構造として、またはそこに組換え、酵素的、もしくは化学的に配置されて修飾すべきペプチド上に存在する。適切な受容体としては、例えば、Gal 1、4GlcNAc、Gal 1、4GalNAc、Gal 1、3GalNAc、ラクト-N-テトラose、Gal 1、3GlcNAc、Gal 1、3Ara、Gal 1、6GlcNAc、Gal 1、4Glc（ラクトース）などのガラクトシル受容体、および当業者に周知の他の受容体が挙げられる（例えば、パウルソン（Paulson）ら、J. Biol. Chem. 253: 5617-5624頁（1978年）を参照）。代表的なシアリルトランスフェラーゼは本明細書に記載されている。

#### 【0258】

1つの実施形態において、シアリルトランスフェラーゼの受容体が糖ペプチドのインビボ合成と同時に修飾される糖ペプチド上に存在する。かかる糖ペプチドは、糖ペプチドのグリコシル化パターンの事前の修飾なしに請求された方法を使用してシアリル化されうる。あるいは、本発明の方法を使用し、適切な受容体を含むことのないペプチドをシアリル化することができ、最初にペプチドを修飾し、当業者に周知の方法によって受容体を含める。代表的な実施形態において、GalNAc残基がGalNAcトランスフェラーゼの作用によって付加される。

#### 【0259】

代表的な実施形態において、ガラクトシル受容体はガラクトース残基をペプチドに連結した適切な受容体、例えば、GlcNAcに結合させることによってアセンブリされる。この方法には修飾すべきペプチドを適切な量のガラクトシルトランスフェラーゼ（例えば、Gal 1、3、またはGal 1、4）、および適切なガラクトシルドナー（例えば、UDP-ガラクトース）でインキュベートするステップを含む。反応は実質的に完了するまで継続され、あるいは、反応は、予め選択された量のガラクトース残基が添加されると終了する。選択されたサッカリド受容体をアセンブリする他の方法は当業者には明らかであろう。

#### 【0260】

さらに別の実施形態において、糖ペプチド連結オリゴ糖が最初に全部または部分的に「トリミングされ」、シアリルトランスフェラーゼの受容体、または1つもしくはそれ以上の適切な残基が付加されて適切な受容体を得る部分を曝露する。グリコシルトランスフェラーゼおよびエンドグリコシダーゼなどの酵素（例えば、米国特許第5,716,812号明細書を参照）は、結合およびトリミング反応に有用である。本方法の別の実施形態において、ペプチドのシアル酸部分は基本的に完全に除去され（例えば、少なくとも90、

10

20

30

40

50

少なくとも95、または少なくとも99%)、修飾シアル酸の受容体を曝露する。

【0261】

次の議論において、本発明の方法はそれに結合されるPEG部分を有する修飾糖の使用によって例示される。議論の焦点は説明の明確さのためである。当業者は、議論が同等に、修飾糖が治療の部分、生体分子、または同様のものを有する実施形態のものと関連することを十分に理解するであろう。

【0262】

炭水化物残基が修飾糖の付加前にトリミングされる本発明の代表的な実施形態において、高マンノースが第1世代の二分岐構造にトリミングバックされる。PEG部分を有する修飾糖が、「トリミングバック」によって曝露される1つもしくはそれ以上の糖残基にコンジュゲートされる。1つの例において、PEG部分がPEG部分にコンジュゲートされたGlcNAc部分によって付加される。修飾GlcNAcは、二分岐構造の末端のマンノース残基の一方または両方に結合される。あるいは、未修飾GlcNAcが分岐種の末端の一方または両方に付加される。

10

【0263】

別の代表的な実施形態において、PEG部分が、末端のマンノース残基へ付加されたGlcNAc残基にコンジュゲートされているガラクトース残基を有する修飾糖によって二分岐構造の末端のマンノース残基の一方または両方に付加される。あるいは、未修飾Galが末端のGlcNAc残基の一方または両方に付加されうる。

【0264】

さらに別の例において、PEG部分が上記のものなど修飾シアル酸を使用してGal残基へ付加される。

20

【0265】

別の代表的な実施形態において、高マンノース構造がマンノースに「トリミングバック」され、そこから二分岐構造が枝分かれする。1つの例において、PEG部分がポリマーで修飾されたGlcNAcによって付加される。あるいは、未修飾GlcNAcがマンノースに付加された後、結合PEG部分を有するGalが付加される。さらに別の実施形態において、未修飾GlcNAcおよびGal残基が連続的にマンノースに付加された後、PEG部分で修飾されたシアル酸部分が付加される。

【0266】

高マンノース構造は基本トリマンノシルコアにもトリミングバックされうる。

30

【0267】

さらに代表的な実施形態において、高マンノースが、第1のマンノース付加されているGlcNAcに「トリミングバック」される。GlcNAcはPEG部分を有するGal残基にコンジュゲートされる。あるいは、未修飾GalがGlcNAcに付加された後、水溶性種で修飾されたシアル酸が付加される。さらに別の例において、末端のGlcNAcがGalでコンジュゲートされ、GlcNAcはその後にPEG部分を有する修飾フコースでフコシル化される。

【0268】

高マンノースはペプチドのAsnに結合した第1のGlcNAcにもトリミングバックされうる。1つの例において、GlcNAc-(Fuc)<sub>n</sub>残基のGlcNAcは水溶性ポリマーを有するGlcNAcでコンジュゲートされる。別の例において、GlcNAc-(Fuc)<sub>n</sub>残基のGlcNAcは、水溶性ポリマーを有するGalで修飾される。さらに別の実施形態において、GlcNAcはGalで修飾された後、PEG部分で修飾されたシアル酸のGalにコンジュゲートされる。

40

【0269】

他の代表的な実施形態が一般的に認められた米国特許出願刊行物に記載されている。すなわち、米国特許出願公開第20040132640号明細書、同第20040063911号明細書、同第20040137557号明細書、米国特許出願第10/369,979号明細書、同第10/410,913号明細書、同第10/360,770号明細書

50

、同第10/410,945号明細書、および国際公開公報(PCT)第US02/32263号明細書であり、その各々は参照により本明細書で援用される。

【0270】

上記の例は、本明細書に記載の方法の能力の説明を提供する。本明細書に記載の方法を使用することにより、実質的にすべての所望の構造の炭水化物残基を「トリミングバック」し、かつ増加させることが可能である。修飾糖は、上記の通り炭水化物部分の末端に付加され、これはペプチドコアと炭水化物の末端との中間に存在しうる。

【0271】

代表的な実施形態において、既存のシアル酸がシアリダーゼを使用して糖ペプチドから除去され、それによって基礎を成すガラクトシル残基のすべてまたはほとんどを脱マスキングする。あるいは、ペプチドまたは糖ペプチドがガラクトース残基、またはガラクトース単位で終わるオリゴ糖残基で標識される。ガラクトース残基の曝露または付加の後、適切なシアリルトランスフェラーゼが修飾シアル酸を付加するために使用される。

【0272】

別の代表的な実施形態において、シアル酸をシアル酸へ移動させる酵素が使用される。この方法は、シアリル化グリカンシアリダーゼで処理し、シアル酸の下にグリカン残基を曝露することなく実施されうる。代表的なポリマー修飾シアル酸がポリ(エチレングリコール)で修飾されたシアル酸である。シアル酸および修飾シアル酸部分をシアル酸残基を含み、グリカン上の既存のシアル酸残基をこれらの種と交換する他の代表的な酵素としては、ST3Gal3、CST-II、ST8Sia-II、ST8Sia-III、およびST8Sia-IVが挙げられる。

【0273】

さらに別の方法において、マスクした反応官能性がシアル酸上に存在する。マスクした反応基は、好ましくは、修飾シアル酸をG-CSFに結合するために使用される条件によって影響を受けない。ペプチドとの修飾シアル酸の共有結合後、マスクは除去され、ペプチドはPEGなどの薬剤でコンジュゲートされる。薬剤は修飾糖残基上の脱マスキングされた反応基とともにその反応によって特殊な方法でペプチドにコンジュゲートされる。

【0274】

修飾糖をその適切なグリコシルトランスフェラーゼとともに、糖ペプチドのオリゴ糖側鎖の末端の糖に応じて使用されうる。上記の通り、PEG化構造の導入のために必要とされる糖ペプチドの末端の糖が発現中に自然に導入され、または発現後に適切なグリコシダーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、またはグリコシダーゼとグリコシルトランスフェラーゼの混合物を使用することにより生成されうる。

【0275】

さらに代表的な実施形態において、UDP-ガラクトース-PEGが1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼと反応し、それによって修飾ガラクトースを適切な末端のN-アセチルグルコサミン構造に移動させる。糖ペプチド上の末端のGlcNAc残基は、哺乳類、昆虫、植物、または真菌などの発現系で起こりうるように発現中に生成されるだけでなく、必要に応じて、シアリダーゼおよび/またはグリコシダーゼおよび/またはグリコシルトランスフェラーゼで糖ペプチドを処理することによっても生成されうる。

【0276】

別の代表的な実施形態において、GNT1-5などのGlcNAcトランスフェラーゼが使用され、PEG化-GlcNAcを糖ペプチド上の末端のマンノース残基に移動させる。さらに別の代表的な実施形態において、Nおよび/またはO連結グリカン構造が酵素的に糖ペプチドから除去され、アミノ酸または末端のグリコシル残基を曝露し、これはその後修飾糖とコンジュゲートされる。例えば、エンドグリカナーゼが使用され、糖ペプチドのN連結構造物を除去して末端のGlcNAcをGlcNAc連結Asnとして糖ペプチド上に曝露する。UDP-Gal-PEGおよび適切なガラクトースイルトランスフェラーゼが使用され、PEG-ガラクトース官能性を曝露GlcNAc上に導入する。

【0277】

10

20

30

40

50

別の実施形態において、修飾糖は直接、糖残基をペプチド骨格に移動することが知られているグリコシルトランスフェラーゼを使用してペプチド骨格に付加される。本発明の実施において有用な代表的なグリコシルトランスフェラーゼとしては、GalNAcトランスフェラーゼ (GalNAcT1-14)、GlcNAcトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼ、グルコシルトランスフェラーゼ、キシロシルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼなどが挙げられるが、これらに限定されない。この方法の使用により、炭水化物を欠くペプチド、あるいは、既存の糖ペプチドへの修飾糖の直接の付加が可能となる。両方の場合に、修飾糖の付加は、グリコシルトランスフェラーゼの基質特異性によって規定されるペプチド骨格上の特定の位置で起こり、化学的方法を使用するタンパク質のペプチド骨格の修飾中に起こるようなランダムな方法では起こらない。一連の薬剤が、適切なアミノ酸配列をポリペプチド鎖へ遺伝子操作することによってグリコシルトランスフェラーゼ基質ペプチド配列を欠くタンパク質または糖ペプチドへ導入される。

10

#### 【0278】

上記の代表的な実施形態の各々において、1つもしくはそれ以上の追加の化学的または酵素的修飾ステップが修飾糖のペプチドとのコンジュゲーション後に使用される。代表的な実施形態において、酵素（例えば、フコシルトランスフェラーゼ）が使用され、グリコシル単位（例えば、フコース）をペプチドに結合した末端の修飾糖へ付加する。別の例では、酵素反応が使用され、修飾糖がコンジュゲートできなかった部位を「キャップ」する。あるいは、化学反応が使用され、コンジュゲート修飾糖の構造を変更する。例えば、コンジュゲート修飾糖は、修飾糖が結合されているペプチド成分とのそのリンケージを安定化または不安定化させる薬剤と反応する。別の例では、修飾糖の成分がペプチドとのそのコンジュゲーション後に脱保護される。当業者は、修飾糖がペプチドにコンジュゲートされた後の段階で本発明の方法において有用である一連の酵素的および化学的方法があることを十分に理解するであろう。さらに、修飾糖-ペプチドコンジュゲートの精緻化が本発明の範囲内である。

20

#### 【0279】

本発明のコンジュゲートを調製するための酵素および反応条件は、本出願の親および共同所有公開PCT特許出願国際公開第03/031464号パンフレット、国際公開第04/033651号パンフレット、国際公開第04/099231号パンフレットにおいて詳しく議論されている。

30

#### 【0280】

選択実施形態において、昆虫細胞で発現されるG-CSFペプチドが、再構築糖ペプチド上のグリカンがGlcNAc-Galグリコシル残基を含むように再構築される。GlcNAcおよびGalの付加は、単一容器で別々の反応として、または単一の反応として起こりうる。この例では、GlcNAc-トランスフェラーゼIおよびGal-トランスフェラーゼIが使用される。修飾シアリル部分がST3Gal-IIIを使用して付加される。

#### 【0281】

別の実施形態において、GlcNAc、Gal、および修飾Siaの付加も上記の酵素を使用して単一の反応容器で起こりうる。酵素再構築および糖PEG化ステップの各々は個別に行われる。

40

#### 【0282】

ペプチドが哺乳類細胞で発現すると、異なる方法が使用される。1つの実施形態において、ペプチドは、修飾シアリ酸をペプチド上のシアリ酸へ移動させ、Sia-Sia-L-R<sup>1</sup>を形成し、ペプチド上のシアリ酸を修飾シアリ酸と交換し、Sia-L-R<sup>1</sup>を形成するシアリルトランスフェラーゼとペプチドを接触させることによってコンジュゲート前に再構築の必要なしにコンジュゲートされる。本方法において使用される代表的酵素がCST-IIIである。シアリ酸をシアリ酸に付加する他の酵素は当業者に周知であり、かかる酵素の例が本明細書に添付の図面に記載されている。

50

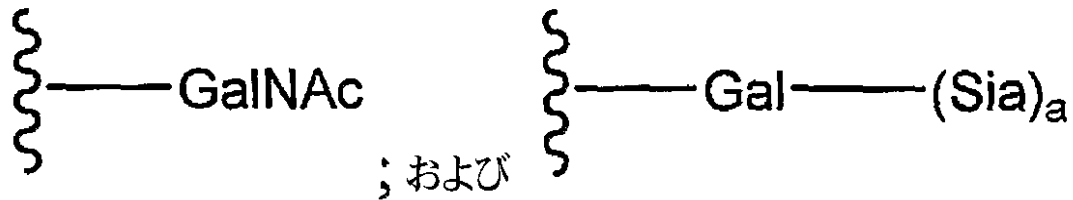
## 【 0 2 8 3 】

本発明のコンジュゲートを調製するさらに別の方法において、哺乳類系で発現されるペプチドはシアリダーゼを使用して脱シアリル化される。曝露Gal残基は、O連結グリカンに特異的なシアリルトランスフェラーゼを使用する修飾シアル酸でシアリル化され、O連結修飾グリカンを持つG-C-S-Fペプチドを提供する。脱シアリル化、修飾G-C-S-Fペプチドは、場合により、ST3GalIIIなどのシアリルトランスフェラーゼを使用することによって部分的または完全に再シアリル化される。

## 【 0 2 8 4 】

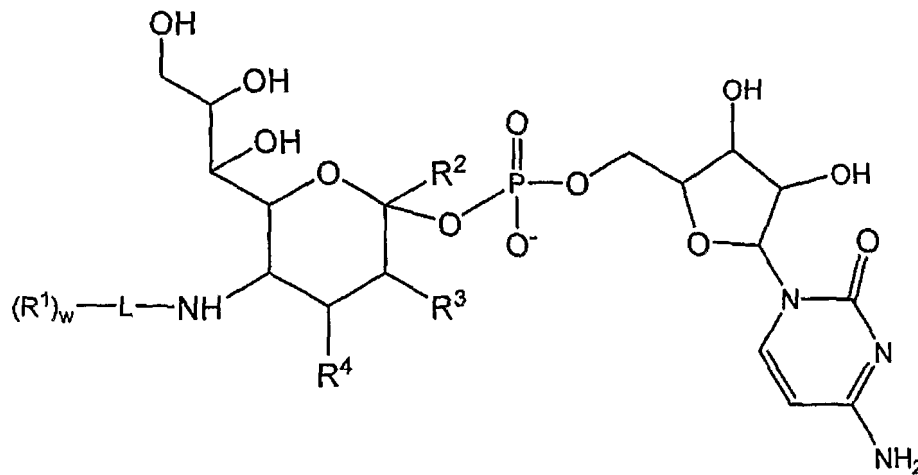
別の態様において、本発明は、本発明のPEG化G-C-S-Fを製造する方法を提供する。この方法は、(a)

## 【 化 6 8 】



から選択されるグリコシル基を含んで成る基質G-C-S-Fペプチドを、式

## 【 化 6 9 】



を有するPEGシアル酸ドナー、および前記グリコシル基のGalNAc、Gal、およびSiaから選択されるメンバー上へ前記ドナーからPEGシアル酸を移動させる酵素と、前記移動に適切な条件下に接触させるステップを含む。代表的な修飾シアル酸ドナーが、リンカー部分により、ポリマー、例えば、直鎖または分岐ポリ(エチレングリコール)部分で修飾されるCMPシアル酸である。本明細書で論じるように、ペプチドは、場合により、修飾糖を結合させる前にGalNAcおよび/またはGalおよび/またはSiaとグリコシル化される(「再構築」)。再構築ステップは、ステップ間のグリコシル化ペプチドの精製なしに同じ容器において順に起こりうる。あるいは、1つもしくはそれ以上の再構築ステップの後、グリコシル化ペプチドはそれを次のグリコシル化またはglyc-PEG化ステップにかける前に精製されうる。

## 【 0 2 8 5 】

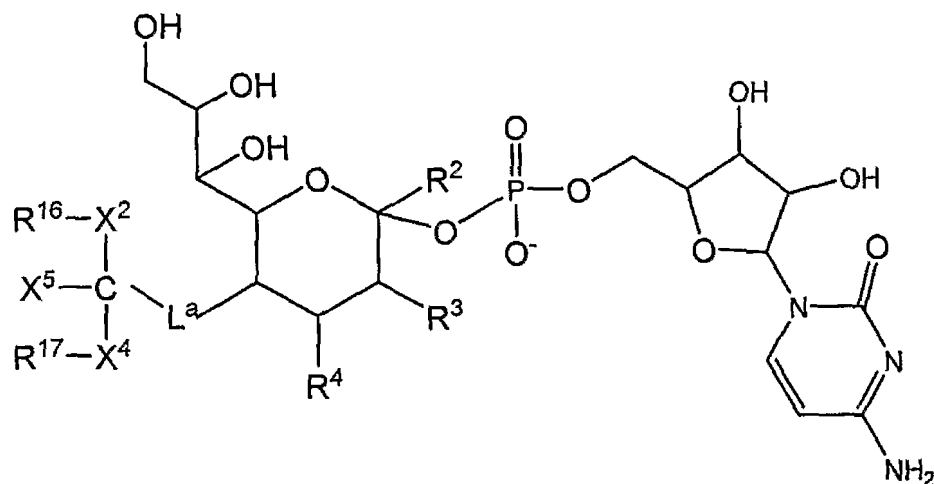
実施例に示され、以下に議論されるように、PEG糖の受容体部分の配置が所望数のステップで行われる。例えば、1つの実施形態において、GalNAcのペプチドへの付加

の後には第2のステップが続くが、ここでPEG糖は同じ反応容器でGalNAcにコンジュゲートされる。あるいは、これら2つのステップは単一容器でほぼ同時に行われる。

【0286】

代表的な実施形態において、PEG-シアル酸ドナーは式

【化70】



10

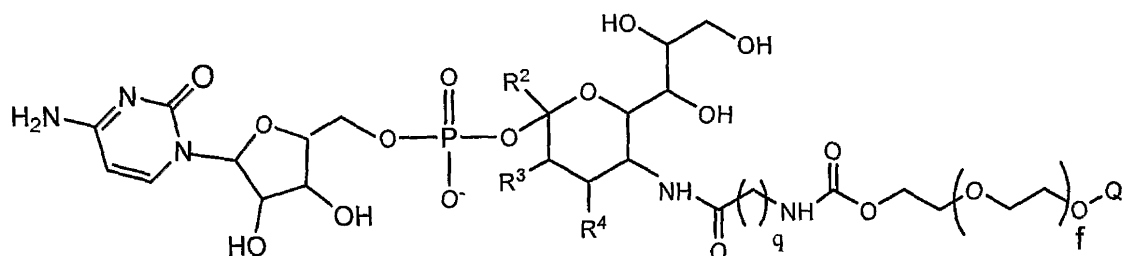
20

を有する。

【0287】

別の代表的な実施形態において、PEG-シアル酸ドナーは式

【化71】



30

を有する。

【0288】

さらに代表的な実施形態において、G-CSFペプチドは糖PEG化または再構築前に適切な発現系で発現される。代表的な発現系としては、Sf-9/バキュロウイルスおよびチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞が挙げられる。

40

【0289】

別の代表的な実施形態において、本発明は、コンジュゲートにおけるG-CSFが基本的に非酸化されている本明細書に記載されているものなどG-CSFのコンジュゲートを形成する方法を提供する。PEG-GCSFのメチオニン残基の酸化は、N末端の配列決定およびペプチドマッピングによって検出される。酸化またはその不在は、RP-HPLCを使用して確認される。例えば、RP-HPLCを使用することにより、ピークまたは主要なPEG-GCSFピークが検出されたが、これはメチオニンが酸化されている(Met-Ox)PEG-GCSF種を表す。GCSFのこのピークはMet127/Met138酸化として確認されており、主要なピークの0.2分前に溶出する。また、Met122酸化として主要なピークのほぼ3分前に溶出する小さなピークが確認されてい

50

る。Met 1 酸化は、60 法を使用してRP - HPLCによって検出されたが、これは主要なピークと共溶出する。このN末端のメチオニン酸化はペプチドマッピングによって検出され、G1 - Oxと呼ばれる。

#### 【0290】

したがって、代表的な実施形態において、本発明は、本明細書に記載されている通り、G - C S Fコンジュゲートの集団を提供し、ここで10%未満、好ましくは、5%未満、より好ましくは、1%未満、より好ましくは、0.5%未満、さらにより好ましくは、0.1%未満、好ましくは、0.05%未満、より好ましくは、0.01%未満、さらにより好ましくは、0.005%未満、およびさらにより好ましくは、0.001%未満の集団のメンバーが、Met 127、Met 138、Met 122、N末端Met、および酸化されているその組合せから選択されるメチオニン残基を含む。

10

#### 【0291】

本発明による代表的な方法において、修飾糖のペプチドとの酵素コンジュゲーションは、ペプチドのメチオニン残基の酸化を阻止または遅らせる条件下に行われる。代表的な実施形態において、反応混合物は追加のメチオニンを含む。本発明の代表的な方法ではコンジュゲーション反応混合物において約20 mMまでのメチオニンが使用される。

#### 【0292】

##### G - C S Fコンジュゲートの精製

上記の方法で製造される生成物は精製なしに使用されうる。しかし、通常、生成物および1つもしくはそれ以上の中間体、例えば、ヌクレオチド糖、分岐および線状PEG種、修飾種、および修飾ヌクレオチド糖を回収することが好ましい。薄層または厚層クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、または膜ろ過などグリコシル化サッカリドの回収のための公知の方法を使用することができる。好ましくは膜ろ過を使用すること、より好ましくは、逆浸透圧膜、または、以下、および本明細書に引用された文献で議論されている回収のための1つもしくはそれ以上のカラムクロマトグラフィー法を使用することが好ましい。例えば、膜が約3000～約10,000の分子量カットオフを有する膜ろ過を使用し、グリコシルトランスフェラーゼなどのタンパク質を除去することができる。次いで、ナノろ過または逆浸透を使用し、塩を除去し、かつ/または生成物サッカリドを精製することができる(例えば、国際公開第98/15581号パンフレットを参照)。ナノフィルター膜は、使用される膜に応じて、一価塩を通過させるが、約100～約2,000ダルトンより大きい多価塩および非荷電溶質保持する逆浸透膜のクラスである。したがって、代表的な用途において、本発明の方法によって調製されたサッカリドは、膜に保持され、夾雑塩は通過する。

20

30

#### 【0293】

ペプチドが、第1のステップとして細胞内で生成される場合は、微粒子デブリ、宿主細胞または溶解断片のいずれかが除去される。糖PEG化の後、PEG化ペプチドは当技術分野で承認されている方法、例えば、遠心分離または限外ろ過によって精製され、場合により、タンパク質は、市販のタンパク質濃度フィルターで濃縮された後、免疫親和性クロマトグラフィー、イオン交換カラム分別(例えば、ジエチルアミノエチル(DEAE)上またはカルボキシメチルもしくはスルホプロピル基を含有するマトリクス上)、ブルー - セファロースでの、CMブルー - セファロース、MONO - Q、MONO - S、レンチルレクチン - セファロース、WGA - セファロース、ConA - セファロース、エーテルトヨパール、ブチルトヨパール、フェニルトヨパール、またはタンパク質Aセファロースでのクロマトグラフィー、SDS - PAGEクロマトグラフィー、シリカクロマトグラフィー、クロマト焦点化、逆相HPLC(例えば、追加脂肪族基を有するシリカ)、例えば、セファデックス分子篩またはサイズ排除クロマトグラフィーを使用するゲルろ過、選択的にポリペプチドを結合するカラム上のクロマトグラフィー、およびエタノールまたは硫酸アンモニウム沈殿から選択される1つもしくはそれ以上のステップによってポリペプチド変異形を他の不純物から分離する。

40

#### 【0294】

50

培養で生成される修飾糖ペプチドは通常、細胞、酵素等からの初期抽出の後、1つもしくはそれ以上の濃縮、塩析、水性イオン交換、またはサイズ排除クロマトグラフィーのステップによって単離される。また、修飾糖タンパク質は親和性クロマトグラフィーによって精製されうる。最後に、HPLCは最終精製ステップのために使用されうる。

#### 【0295】

プロテアーゼ阻害剤、例えば、メチルスルホニルフッ化物(PMSF)を、前記ステップのいずれかに含め、タンパク質分解を阻害することができ、抗生物質または保存剤を含め、付随的汚染物質の成長を阻止することができる。

#### 【0296】

別の実施形態により、発明の修飾糖ペプチドを生成する系からの上清を、市販のタンパク質濃度フィルター、例えば、アミコン(Amicon)またはミリポア(Millipore)限外ろ過ユニットを使用して最初に濃縮する。濃縮ステップの後、濃縮物は適切な精製マトリックスに適用されうる。例えば、適切な親和性マトリックスが、ペプチドのリガンド、適切な担体に結合したレクチンまたは抗体を含んで成りうる。あるいは、陰イオン交換樹脂、例えば、懸垂DEAE基を有するマトリックスまたは基質が使用されうる。適切なマトリックスとしては、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース、またはタンパク質精製において一般的に使用される種類が挙げられる。あるいは、陽イオン交換ステップが使用されうる。適切な陽イオン交換としては、スルホプロピルまたはカルボキシメチル基を含んで成るさまざまな不溶性マトリックスが挙げられる。

#### 【0297】

精製において使用される他の方法としては、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、およびブルーセファロースでのクロマトグラフィーが挙げられる。これらおよび他の有用な方法は、同時譲渡米国仮特許第(代理人整理番号第40853-01-5168-P1、2005年5月6日出願)において説明されている。

#### 【0298】

疎水性RP-HPLC培地、例えば、懸垂メチルまたは他の脂肪族基を有するシリカゲルを有する1つもしくはそれ以上のRP-HPLCステップを使用し、さらにポリペプチドコンジュゲート組成物を精製することができる。さまざまな組合せで前記精製ステップの一部または全部を使用し、同種または基本的に同種の修飾糖タンパク質を提供することもできる。

#### 【0299】

大規模発酵に由来する本発明の修飾糖ペプチドは、ウルダル(Urdal)ら、J. Chromatog. 296:171頁(1984年)によって開示されたものと類似の方法によって精製されうる。この文献では、調製HPLCカラムでの組換えヒトIL-2の精製のための2つの連続的RP-HPLCステップが記載されている。あるいは、親和性クロマトグラフィーなどの方法を使用し、修飾糖タンパク質を精製することができる。

#### 【0300】

代表的な実施形態において、精製は、一般的に所有される、同時譲渡米国仮特許第60/665,588号明細書、2005年3月24日出願に記載されている方法によって行われる。

#### 【0301】

別の代表的な実施形態において、精製は溶離剤として適切な緩衝液を使用するSPHPクロマトグラフィーによって達成される。代表的な緩衝液としては、クエン酸および酢酸緩衝液が挙げられるが、クエン酸が現在、好ましい。

#### 【0302】

さらに代表的な実施形態において、リン酸塩、例えば、リン酸ナトリウムが酵素コンジュゲーション反応混合物に添加される。反応混合物は遠心分離され、結果として生じる混合物はSPHPによって精製される。

本実施形態において、GCSFに共有結合していない遊離メチオンが、精製ステップ中に



存在または非存在である。上記の代表的の精製方法は結果として、本明細書に記載されている通り、G - C S F コンジュゲートの集団の単離をもたらすが、ここで10%未満、好ましくは、5%未満、より好ましくは、1%未満、より好ましくは、0.5%未満、さらにより好ましくは、0.1%未満、好ましくは、0.05%未満、より好ましくは、0.01%未満、さらにより好ましくは、0.005%未満、およびさらにより好ましくは、0.001%未満の集団のメンバーが、Met 127、Met 138、Met 122、N末端Met、および酸化されているその組合せから選択されるメチオニン残基を含む。

#### 【0303】

さらに別の代表的実施形態において、精製G - C S F コンジュゲート組成物はG - C S F ペプチドの集団を含み、10%未満、好ましくは、5%未満、より好ましくは、1%未満、より好ましくは、0.5%未満、さらにより好ましくは、0.1%未満、好ましくは、0.05%未満、より好ましくは、0.01%未満、さらにより好ましくは、0.005%未満、およびさらにより好ましくは、0.001%未満のペプチドの集団が、サイズ排除クロマトグラフィーによって測定されるようにペプチド凝集体に結合される。

#### 【0304】

##### 医薬組成物

別の態様において、本発明は医薬組成物を提供する。医薬組成物としては、医薬的に許容される希釈剤、および非天然起源、PEG部分、治療的部分、または生体分子、およびグリコシル化もしくは未グリコシル化ペプチド間の共有コンジュゲートが挙げられる。ポリマー、治療的部分、または生体分子は、ペプチドおよびポリマー、治療的部分または生体分子の間に挿入され、これらに共有連結した無傷グリコシル連結基によってペプチドにコンジュゲートされる。

#### 【0305】

本発明の医薬組成物は、さまざまな薬物送達系において使用されるために適切である。本発明において使用される適切な製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences、メース・パブリッシング・カンパニー(Mace Publishing Company)、Philadelphia、ペンシルベニア州(PA)、第17版、(1985年)において確認される。薬物送達の方法の簡単な検討については、ランガー(Langer)、Science 249:1527-1533頁(1990年)を参照。

#### 【0306】

医薬組成物は、例えば、局所、経口、鼻内、静脈内、頭蓋内、腹腔内、皮下、または筋肉投与を含む適切な投与の方法のために形成されうる。皮下注射などの非経口投与のために、担体は、好ましくは、水、食塩水、アルコール、脂肪、ろう、または緩衝液を含んで成る。経口投与のために、上記の担体、またはマニトール、ラクトース、でんぷん、マグネシウムステアリン酸、サッカリンナトリウム、タルカム、セルロース、グルコース、スクロース、およびマグネシウム炭酸塩などの固体担体を使用することができる。生体分解性マイクロスフェア(例えば、ポリ乳酸ポリグリコレート)も本発明の医薬組成物の担体として使用されうる。適切な生体分解性マイクロスフェアが、例えば、米国特許第4,897,268号明細書および同第5,075,109号明細書で開示されている。

#### 【0307】

一般に、医薬組成物は非経口、例えば、静脈内投与される。したがって、本発明は、許容される担体、好ましくは、水性担体、例えば、水、緩衝水、食塩水、PBSなどに溶解または懸濁された化合物を非経口投与用の組成物を提供する。組成物は、pH調節および緩衝剤、等張化剤、湿潤剤、界面活性剤などの生理的条件に近づけるために必要な医薬的に許容される補助剤を含有しうる。

#### 【0308】

これらの組成物は、従来の滅菌法によって滅菌され、または滅菌ろ過されうる。結果として生じる水溶液は、使用のためにパッケージされ、または凍結乾燥され、凍結乾燥調製液は投与前に滅菌水性担体と混合される。調製液のpHは一般的に3~11、より好まし

10

20

30

40

50

くは、5～9、最も好ましくは、7～8である。

【0309】

一部の実施形態において、本発明の糖ペプチドは、標準ベシクル形成脂質から形成されるリポソームへ組込まれる。リポソームを調製するさまざまな方法が利用可能であるが、例えば、スゾカ (Szoka) ら、Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467頁 (1980年)、米国特許第4,235,871号明細書、同第4,501,728号明細書、および同第4,837,028号明細書に記載されている通りである。さまざまな標的薬剤 (例えば、本発明のシアリルガラクトシド) を用いてリポソームで標的化することが当業界で公知である (例えば、米国特許第4,957,773号明細書、および同第4,603,04号明細書を参照)。

10

【0310】

標的薬剤をリポソームに結合するための標準方法が使用される。これらの方法は一般に、標的薬剤、または本発明の脂質誘導体化糖ペプチドなど誘導体化親油性化合物の結合のために活性化されるホスファチジルエタノールアミンなど脂質成分のリポソームへの組込みを含む。

【0311】

標的機序は一般に、標的部分が標的、例えば、細胞表面受容体との相互作用のために利用可能であるような方法で標的薬剤がリポソームの表面上に配置されることが必要である。本発明の炭水化物は、当業者に周知の方法 (例えば、それぞれ、長鎖アルキルハロゲン化物または脂肪酸を有する炭水化物上に存在するヒドロキシル基のアルキル化またはアシル化) を使用してリポソームが形成される前に脂質分子に結合される。あるいは、リポソームは、連結部が最初に膜を形成する時点で膜へ組込まれるような方法で構築される。連結部は、膜にしっかりと組込まれて固定される親油性部分を有する必要がある。リポソームの水性表面上で化学的に利用可能である反応部も有する必要がある。反応部は、後に付加される標的薬剤または炭水化物との安定した化学結合を形成することが化学的に適切であるように選択される。場合によっては、標的薬剤を連結分子に直接結合させることが可能であるが、ほとんどの場合、橋として作用する第3の分子を使用することがより適切であり、したがって、ベシクル表面から三次元的に延びる標的薬剤または炭水化物とともに膜にある連結分子を連結する。

20

【0312】

本発明の方法によって調製される化合物は、診断上の試薬としても使用される。例えば、例えば、標識化合物を使用し、炎症を有することが疑われる患者における炎症または腫瘍転移の部位を局在することができる。この用途のために、化合物は<sup>125</sup>I、<sup>14</sup>C、またはトリチウムで標識される。

30

【0313】

本発明の医薬組成物において使用される活性成分は、糖PEG化G-CSF、および刺激顆粒球生成の生物特性を有するその誘導体である。好ましくは、本発明のG-CSF組成物は、非経口 (例えば、IV、IM、SC、またはIP) 投与される。有効な投与量は、治療される状態および投与経路によって大幅に変動することが予想されるが、活性材料の約0.1 (約7U) ~ 100 (約7000U) μg/kg体重の範囲であることが予想される。貧血状態の治療のための好ましい用量は、週3回約50~約300単位/kgである。本発明はインビボ滞留時間の増大したG-CSFを提供するため、上記投与量は場合により本発明の組成物が投与されると低下される。

40

【0314】

本発明の組成物の調製における種の調製方法は一般にさまざまな特許刊行物、例えば、米国特許出願公開第20040137557号明細書、国際公開第04/083258号パンフレット、および国際公開第04/033651号パンフレットに記載されている。次の実施例は、本発明のコンジュゲート、および方法を説明するために提供されるが、請求される発明を限定するためには提供されていない。

【0315】

50

代表的な実施形態において、本発明は、本明細書に記載されているような、医薬的に許容される担体と組合せた G - C S F コンジュゲートの集団を含む医薬製剤を提供する。本発明の好ましい製剤は、緩衝液、界面活性剤、およびポリオールを含む。

#### 【0316】

代表的な製剤は、約 1 m g / m L ~ 約 1 0 0 m g / m L、好ましくは、約 5 m g / m L ~ 約 7 5 m g / m L、かつより好ましくは、約 1 0 m g / m L ~ 約 5 0 m g / m L の量でのペプチドコンジュゲートを含む。

#### 【0317】

代表的な製剤は、約 1 m M ~ 約 1 0 0 m M、好ましくは、約 5 m M ~ 約 7 5 m M、かつより好ましくは、約 1 0 m M ~ 約 5 0 m M の濃度で緩衝液を含む。

10

#### 【0318】

代表的な製剤において、界面活性剤は、約 0 . 0 0 0 0 1 % ~ 約 1 0 %、好ましくは、約 0 . 0 0 0 0 5 % ~ 約 1 %、より好ましくは、約 0 . 0 0 0 1 % ~ 約 0 . 1 %、より好ましくは、約 0 . 0 0 0 5 % ~ 約 0 . 0 0 5 %、かつさらにより好ましくは、約 0 . 0 0 1 % ~ 約 0 . 0 1 % の量で存在する。

#### 【0319】

代表的な製剤において、ポリオールは、約 1 m g / m L ~ 1 0 0 m g / m L、好ましくは、約 1 0 m g / m L ~ 約 7 5 m g / m L、より好ましくは、約 1 5 m g / m L ~ 約 5 0 m g / m L の量で存在する。

#### 【0320】

20

代表的な実施形態において、製剤の p H は約 3 ~ 約 7 . 5、好ましくは、約 4 ~ 約 6 . 5、かつより好ましくは、約 5 ~ 約 6 である。ペプチドコンジュゲートの構造がどうであれ、ペプチドの p I の約 0 . 5 p H 単位の範囲内である p H で調製されることが一般に好ましい。

#### 【0321】

代表的な実施形態において、界面活性剤はツイーン ( T w e e n )、例えば、ツイーン ( T w e e n ) 2 0 である。さらに代表的な実施形態において、ポリオールはソルビトールである。別の実施形態において、緩衝液は酢酸ナトリウムである。

#### 【0322】

本発明の代表的な製剤としては、1 0 m M N a O A c、0 . 0 0 3 % ツイーン ( T w e e n ) 2 0、および p H 4 . 0 での 5 0 m g / m L ソルビトールの混合物中の G - C S F コンジュゲート ( 2 m g / m L ) が挙げられる。

30

#### 【実施例】

#### 【0323】

##### 実施例 1

C H O 細胞において生成される G - C S F の糖 P E G 化

a . アシアロ顆粒球コロニー刺激因子 ( G - C S F ) の調製

C H O 細胞で生成された G - C S F を 5 0 m M トリス 5 0 m M トリス - H C l p H 7 . 4、0 . 1 5 M N a C l、5 m M C a C l <sub>2</sub> 中 2 . 5 m g で溶解し、セントリコン・プラス ( C e n t r i c o n P l u s ) 2 0 遠心ろ過機中で 5 0 0 μ L に濃縮した。溶液を 3 0 0 m U / m L ノイラミニダーゼ I I ( V i v r i o C h o k e r a e ) で 1 6 時間 3 2 ° C にインキュベートした。反応をモニタリングするために、小アリコートの実験物を適切な緩衝液で希釈し、I E F ゲルを実行した。次いで、反応混合物を予め洗浄した N - ( p - アミノフェニル) オキサミド酸 - アガロースコンジュゲートに添加し ( 8 0 0 μ L / m L 反応容積)、洗浄ビーズを静かに 2 4 時間、4 ° C に回転した。混合物を 1 0 , 0 0 0 r p m で遠心分離し、上清を採集した。ビーズをトリス - E D T A 緩衝液で 3 回、0 . 4 m L のトリス - E D T A 緩衝液で 1 回、0 . 2 m L のトリス - E D T A 緩衝液で 1 回洗浄し、すべての上清をプールした。上清を 4 ° C、5 0 m M トリス - H C l p H 7 . 4、1 M N a C l、0 . 0 5 % N a N <sub>3</sub> に対して透析し、次いでさらに 2 回、5 0 m M トリス - H C l p H 7 . 4、1 M N a C l、0 . 0 5 % N a N <sub>3</sub> に対して透析し

40

50

た。次いで、透析溶液を、セントリコン・プラス20遠心ろ過機を使用して濃縮し、-20℃下に保存した。IEFゲルの条件をインビトロジェン (Invitrogen) によって供給された方法および試薬に従い実行した。天然および脱シアリル化G-CSFの試料を水に対して透析し、MALDI-TOF MSによって分析した。

#### 【0324】

b. G-CSF - (アルファ2, 3) - シアリル - PEGの調製

脱シアリル化G-CSFを50mMトリス-HCl、0.15M NaCl、0.05% NaN<sub>3</sub>、pH7.2中2.5mg/mLで溶解した。溶液を1mM CMP - シアル酸 - PEGおよび0.1U/mLのST3Gal1で32℃下、2日間インキュベートした。2日後、反応混合物をPBS緩衝液 (pH7.1) を使用し、画分を採集するトソ・ハース (Toso Haas) G3000SW調製カラムを使用して精製した。反応性生物をSDS-PAGEおよびIEF分析を使用してインビトロジェン (Invitrogen) によって供給された方法および試薬に従い分析した。天然およびPEG化G-CSFの試料を水に対して透析し、MALDI-TOF MSによって分析した。

10

#### 【0325】

c. G-CSF - (アルファ2, 8) - シアリル - PEGの調製

アルファ2, 3 - シアリル化O連結グリカンを含むCHO細胞で生成されたG-CSFを50mMトリス-HCl、0.15M NaCl、0.05% NaN<sub>3</sub>、pH7.2中2.5mg/mLで溶解した。溶液を1mM CMP - シアル酸 - PEGおよび0.1U/mLのCST-IIで32℃下、2日間インキュベートした。2日後、PBS緩衝液 (pH7.1) を使用し、画分ベースを採集するトソ・ハース (Toso Haas) G3000SW調製カラムを使用して反応混合物を精製した。反応性生物をSDS-PAGEおよびIEF分析を使用してインビトロジェン (Invitrogen) によって供給された方法および試薬に従い分析した。天然およびPEG化G-CSFの試料を水に対して透析し、MALDI-TOF MSによって分析した。

20

#### 【0326】

d. G-CSF (アルファ2, 6) - シアリル - PEGの調製

O連結GalNAcのみを含むG-CSFを50mMトリス-HCl、0.15M NaCl、0.05% NaN<sub>3</sub>、pH7.2中2.5mg/mLで溶解する。溶液を1mM CMP - シアル酸 - PEGおよび0.1U/mLのST6GalNAcIまたはIIで32℃下、2日間インキュベートした。2日後、PBS緩衝液 (pH7.1) を使用し、画分を採集するトソ・ハース (Toso Haas) G3000SW調製カラムを使用して、反応混合物を精製した。反応性生物をSDS-PAGEおよびIEF分析を使用してインビトロジェン (Invitrogen) によって供給された方法および試薬に従い分析した。天然およびPEG化G-CSFの試料を水に対して透析し、MALDI-TOF MSによって分析した。

30

#### 【0327】

CHO細胞で生成されたG-CSFをアルスロバクター・シアリダーゼ (Arthrobacter sialidase) で処理し、次いでSuperdex 75でサイズ排除によって精製し、ST3Gal1またはST3Gal2で処理し、次いでCMP-SA-PEG 20kDaで処理した。結果として生じる分子をイオン交換およびゲルろ過によって精製し、SDS-PAGEによる分析により、PEG化が完了したことが明らかにされた。これはO連結グリカンの糖PEG化の最初の証明である。

40

#### 【0328】

##### 実施例2

##### 2ポットでの2つの酵素法

次の実施例では2つの連続ステップにおけるG-CSF-GalNAc-SA-PEGの調製が例示され、ここで各々の中間生成物は次にステップで使用される前に精製される。

#### 【0329】

50

a.  $\text{GalNAc-T2}$  を使用する  $\text{G-CSF}$  および  $\text{UDP-GalNAc}$  からの  $\text{G-CSF-GalNAc}$  ( $\text{pH} 6.2$ ) の調製

パッケージされた緩衝液  $3.2 \text{ mL}$  中  $\text{G-CSF}$  ( $960 \text{ mcg}$ ) を、 $\text{UF}$  フィルター ( $\text{MWCO} 5 \text{ K}$ ) を使用する限外ろ過によって濃縮し、次いで  $25 \text{ mM}$   $\text{MES}$  緩衝液 ( $\text{pH} 6.2$ 、 $0.005\% \text{ NaN}_3$ )  $1 \text{ mL}$  で再構成した。 $\text{UDP-GalNAc}$  ( $6 \text{ mg}$ 、 $9.24 \text{ mM}$ )、 $\text{GalNAc-T2}$  ( $40 \mu\text{L}$ 、 $0.04 \text{ U}$ )、および  $100 \text{ mM}$   $\text{MnCl}_2$  ( $40 \mu\text{L}$ 、 $4 \text{ mM}$ ) を次いで添加し、結果として生じる溶液を室温下にインキュベートした。

#### 【0330】

24 時間後、 $\text{MALDI}$  は、反応が完了したことを示した。反応混合物を直接、 $\text{SEC}$  ( $\text{Superdex} 75$  および  $\text{Superdex} 200$ )、および  $\text{PBS}$  (リン酸緩衝生理食塩水、 $\text{pH} 4.9$  および  $0.005\% \text{ Tween} 80$ ) を含んで成る溶出緩衝液を使用する  $\text{HPLC}$  精製にかけた。 $\text{G-CSF-GalNAc}$  の採集ピークをセントリコン ( $\text{Centricon}$ )  $5 \text{ KDa MWCO}$  フィルターを使用して約  $150 \mu\text{L}$  に濃縮し、 $\text{PBS}$  (リン酸緩衝生理食塩水、 $\text{pH} 4.9$  および  $0.005\% \text{ Tween} 80$ ) を思量して容積を  $1 \text{ mL}$  に調節した。最終タンパク質濃度  $1 \text{ mg/mL}$  ( $A_{280}$ )、収率  $100\%$ 。試料 4 下に保存した。

#### 【0331】

b. 精製  $\text{G-CSF-GalNAc}$ 、 $\text{CMP-SA-PEG}$  ( $20 \text{ KDa}$ ) およびマウス  $\text{ST6GalNAc-1}$  ( $\text{pH} 6.2$ ) を使用する  $\text{G-CSF-GalNAc-SA-PEG}$  の調製

タンパク質  $1 \text{ mg}$  を含有する  $\text{G-CSF-GalNAc}$  溶液を  $25 \text{ mM}$   $\text{MES}$  緩衝液 ( $\text{pH} 6.2$ 、 $0.005\% \text{ NaN}_3$ ) へ緩衝液交換し、 $\text{CMP-SA-PEG}$  ( $20 \text{ KDa}$ ) ( $5 \text{ mg}$ 、 $0.25 \mu\text{mol}$ ) を添加した。溶解後、 $\text{MnCl}_2$  ( $100 \mu\text{L}$ 、 $100 \text{ mM}$  溶液) および  $\text{ST6GalNAc-I}$  ( $100 \mu\text{L}$ 、マウス酵素) を添加し、反応混合物をゆっくり  $32^\circ\text{C}$  下に 3 日間振動させた。反応混合物を限外ろ過 ( $\text{MWCO} 5 \text{ K}$ ) によって濃縮し、緩衝液を  $25 \text{ mM}$   $\text{NaOAc}$  ( $\text{pH} 4.9$ ) で 1 回交換し、次いで全容積  $1 \text{ mL}$  に濃縮した。次いで生成物を  $\text{SP-セファロース}$  ( $A: 25 \text{ mM}$   $\text{NaOAc} + 0.005\% \text{ Tween} 80$   $\text{pH} 4.5$ 、 $B: 25 \text{ mM}$   $\text{NaOAc} + 0.005\% \text{ Tween} 80$   $\text{pH} 4.5 + 2 \text{ M}$   $\text{NaCl}$ ) を保持時間  $13 - 18$  分、 $\text{SEC}$  ( $\text{Superdex} 75$ 、 $\text{PBS-pH} 7.2$ 、 $0.005\% \text{ Tween} 80$ ) を保持時間  $8.6$  分 ( $\text{superdex} 75$ 、フロー  $1 \text{ mL/分}$ ) で使用して精製した。所望の画分を採集し、 $0.5 \text{ mL}$  に濃縮し、4 下に保存した。

#### 【0332】

#### 実施例 3

酵素の同時添加による  $\text{G-CSF-GalNAc-SA-PEG}$  を製造する 1 ポット法

次の実施例では、酵素の同時添加を使用する 1 ポットでの  $\text{G-CSF-GalNAc-SA-PEG}$  の調製が例示される

#### 【0333】

a. マウス  $\text{ST6GalNAc-I}$  ( $\text{pH} 6.0$ ) を使用する 1 ポット法。

$\text{G-CSF}$  (生成物精製緩衝液  $3.2 \text{ mL}$  中に溶解したタンパク質  $960 \mu\text{g}$ ) を限外ろ過 ( $\text{MWCO} 5 \text{ K}$ ) によって  $0.5 \text{ mL}$  に濃縮し、 $25 \text{ mM}$   $\text{MES}$  緩衝液 ( $\text{pH} 6.0$ 、 $0.005\% \text{ NaN}_3$ ) で全容積を約  $1 \text{ mL}$  またはタンパク質濃度を  $1 \text{ mg/mL}$  に再構成した。 $\text{UDP-GalNAc}$  ( $6 \text{ mg}$ 、 $9.21 \mu\text{mol}$ )、 $\text{GalNAc-T2}$  ( $80 \mu\text{L}$ 、 $80 \text{ mU}$ )、 $\text{CMP-SA-PEG}$  ( $20 \text{ KDa}$ ) ( $6 \text{ mg}$ 、 $0.3 \mu\text{mol}$ ) およびマウス酵素  $\text{ST6GalNAc-I}$  ( $120 \mu\text{L}$ ) および  $100 \text{ mM}$   $\text{MnCl}_2$  ( $50 \mu\text{L}$ ) を次いで添加した。溶液を  $32^\circ\text{C}$  下に 48 時間振動させ、 $\text{SP}$  セファロースで標準クロマトグラフィー条件を使用して精製した。合計  $0.5 \text{ mg}$  のタンパク質 ( $A_{280}$ ) が得られ、または全体的収率が約  $50\%$  であった。生成物構造を  $\text{MALDI}$  および  $\text{SDS-PAGE}$  による分析によって確認した。

## 【0334】

b. ニワトリST6GalNAc-I (pH6.0)を使用する1ポット法。

G-CSF 14.4mgを3mL最終容積に濃縮し、25mM MES緩衝液(pH6.0、0.005%NaN<sub>3</sub>、0.004%トウイン80)で緩衝液交換し、容積を13mLに調節した。UDP-GalNAc(90mg、150μmol)、GalNAc-T2(0.59U)、CMP-SA-PEG-20kDa(90mg)、ニワトリST6GalNAc-I(0.44U)、および100mM MnCl<sub>2</sub>(600mcL)を次いで添加した。結果として生じる混合物を室温下に60時間保存した。次いで、反応混合物をUF(MWCO5K)および遠心分離を使用して濃縮した。残留物(約2mL)を25mM NaOAc緩衝液(pH4.5)中に溶解し、再び最終容積5mLに濃縮した。この試料を、SPセファロースを約10-23分間、SEC(Superdex75、17分、流量0.5mL/分)、および追加のSEC(Superdex200、23分、流量0.5mL/分)を使用して精製し、3.6mg(全体的収率25%)のG-CSF-GalNAc-SA-PEG-20kDaを得た(A<sub>280</sub>およびBCA法)。

10

## 【0335】

## 実施例4

酵素の連続的添加によるG-CSF-GalNAc-Gal-SA-PEGを製造する1ポット法

次の実施例では酵素の連続的添加による1ポットでG-CSF-GalNAc-Gal-SA-PEGを製造する方法が例示される。

20

## 【0336】

a. GalNAc-G-CSFからの開始

1. GalNAc-T2を使用するG-CSFおよびUDP-GalNAcからのG-CSF-GalNAc(pH6.2)調製

パッケージされた緩衝液3.2mL中G-CSF(960mcg)を、UFフィルター(MWCO5K)を使用する限外ろ過によって濃縮し、次いで25mM MES緩衝液(pH6.2、0.005%NaN<sub>3</sub>)1mLで再構成した。UDP-GalNAc(6mg、9.24mM)、GalNAc-T2(40μL、0.04U)、および100mM MnCl<sub>2</sub>(40μL、4mM)を次いで添加し、結果として生じる溶液を室温下にインキュベートした。

30

## 【0337】

2. G-CSF-GalNAcからのG-CSF-GalNAc-Gal-SA-PEGの調製、UDP-ガラクトース、SA-PEG-20kDa、および適切な酵素

UDP-ガラクトース(4mg、6.5μmol)、コア-1-Gal-T(320μL、160mU)、CMP-SA-PEG-20kDa(8mg、0.4μmol)、ST3Gal2(80μL、0.07mU)および100mM MnCl<sub>2</sub>(80μL)を直接、上記a.のステップからの25mM MES緩衝液(pH6.0)1.5mL中G-CSF-GalNAc(1.5mg)の粗反応混合物に添加した。結果として生じる混合物を32℃下に60時間インキュベートした。反応混合物を遠心分離し、限外ろ過(MWCO5K)を使用して溶液を0.2mLに濃縮し、次いで25mM NaOAc(pH4.5)で再溶解して最終容積を1mLにした。SPセファロース(保持時間10~15分)を使用して生成物を精製し、スピンフィルター(MWCO5K)を使用してピーク画分を濃縮し、残留物をさらにSEC(Superdex75、保持時間10.2分)を使用して精製した。スピンフィルター(MWCO5K)を使用する濃縮後、タンパク質をPBS、2.5%マニトール、0.005%ポリソルベート、pH6.5による製剤緩衝液を使用して1mLに希釈し、mL当り850μgタンパク質のタンパク質濃度で形成した(A<sub>280</sub>)。全体的収率は55%であった。

40

## 【0338】

## 実施例5

酵素の同時添加によるG-CSF-GalNAc-Gal-SA-PEGを製造する1ポ

50

## ット法

## a. G - C S Fからの開始

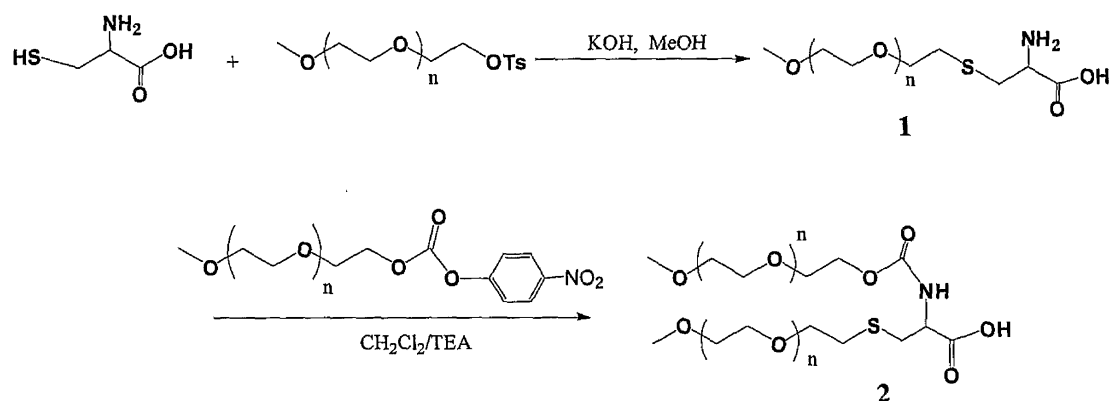
G - C S F ( 9 6 0 m c g、 3 . 2 m L ) を限外ろ過 ( M W C O 5 K ) で濃色し、 2 5 m M M e s 緩衝液 ( p H 6 . 0、 0 . 0 0 5 % N a N <sub>3</sub> ) で再構成した。 G - C S F 溶液の全容積は約 1 m g / m L であった。 U D P - G a l N A c ( 6 m g )、 G a l N A c - T 2 ( 8 0 μ L、 ~ 8 0 μ U )、 U D P - G a l ( 6 m g )、 コア 1 G a l T ( 1 6 0 μ L、 8 0 μ U )、 C M P - S A - P E G ( 2 0 K ) ( 6 m g ) およびシアリルトランスフェラーゼ、例えば、 S T 3 G a l 1 ( 1 6 0 μ L、 1 2 0 μ U )、 1 0 0 m M M n C l <sub>2</sub> ( 4 0 μ L ) を添加した。結果として生じる混合物を 3 2 下 に 4 8 時間インキュベートした。 I E X および S E C を使用して下記の通り精製を行った。生成物を含有する結果として生じる画分を、限外ろ過 ( M W C O 5 K ) を使用して濃縮し、容積を緩衝液で約 1 m L に調節した。タンパク質濃度は A <sub>280</sub> によって 0 . 3 9 2 m g / m L であることが判定され、 G - C S F からの全体的な収率 4 0 % を示した。

【 0 3 3 9 】

## 実施例 6

シス테인 - P E G <sub>2</sub> ( 2 ) の調製

【 化 7 2 】



## a. 化合物 1 の合成

水酸化カリウム ( 8 4 . 2 m g、 1 . 5 m m o l、粉末として ) をアルゴン下の無水メタノール ( 2 0 L ) 中 L - シス테인 ( 9 3 . 7 m g、 0 . 7 5 m m o l ) の溶液に添加した。混合物を室温下に 3 0 分間攪拌し、次いで分子量 2 0 キロダルトンの m P E G - O - トシレート ( T s、 1 . 0 g、 0 . 0 5 m m o l ) を 2 時間 にわたっていくつかの部分で添加した。混合物を室温下に 5 日間攪拌し、ロータリーエバポレーションによって濃縮した。残留物を水 ( 3 0 m L ) で希釈し、室温下に 2 時間攪拌し、過剰な 2 0 キロダルトンの m P E G - O - トシレートを破壊した。次いで溶液を酢酸で中和し、pH を pH 5 . 0 に調節し、逆相クロマトグラフィー ( C - 1 8 シリカ ) カラム上に装填した。カラムをメタノール / 水のグラジエントで溶出し ( 生成物は約 7 0 % のメタノールを溶出 )、生成物溶出を蒸発光散乱によってモニタリングし、適切な画分を採集し、水 ( 5 0 0 m L ) で希釈した。この溶液をクラマトグラフ ( イオン交換、 X K 5 0 Q、 B I G ビーズ、 3 0 0 m l、水酸化物形態、水の水 / 酢酸に対するグラジエント - 0 . 7 5 N )、適切な画分の pH を酢酸で 6 . 0 に低下させた。次いで、この溶液を逆相カラム ( C - 1 8 シリカ ) で捕捉し、上記のメタノール / 水のグラジエントで溶出した。生成物画分をプールし、濃縮し、水中に再溶解し、凍結乾燥して 4 5 3 m g ( 4 4 % ) の白色固体 ( 1 ) を得た。化合物の構造的データは次の通りであった。 <sup>1</sup> H - N M R ( 5 0 0 M H z、 D <sub>2</sub> O ) 2 . 8 3 ( t、 2 H、 O - C - C H <sub>2</sub> - S )、 3 . 0 5 ( q、 1 H、 S - C H H - C H N )、 3 . 1 8 ( q、 1 H、 ( q、 1 H、 S - C H H - C H N )、 3 . 3 8 ( s、 3 H、 C H <sub>3</sub> O )、 3 . 7 ( t、 O C H <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> O )、 3 . 9 5 ( q、 1 H、 C H N )。生成物の純度

は SDS PAGE によって確認された。

#### 【0340】

b. 化合物 2 (システイン - PEG<sub>2</sub>) の合成

トリエチルアミン (約 0.5 mL) を溶液が塩基性になるまで無水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) 中に溶解した化合物 1 (440 mg、22 μmol) の溶液に滴下した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) 中 20 キロダルトンの mPEG-O-p-ニトロフェニル炭酸塩 (660 mg、33 μmol) および N-ヒドロキシスクシンイミド (3.6 mg、30.8 μmol) の溶液を室温下に 1 時間にわたっていくつかの部分で添加した。反応混合物を室温下に 24 時間拡販した。次いで溶媒をロータリーエバポレーションによって除去し、残留物を水 (100 mL) 中に溶解し、pH を 1.0 N NaOH で 9.5 に調節した。塩基性溶液を室温下に 2 時間攪拌し、次いで酢酸で pH 7.0 に中和した。次いで、溶液を逆相クロマトグラフィー (C-18 シリカ) 上に装填した。カラムをメタノール / 水のグラジエントで溶出し (生成物は 70 % メタノールで溶出する)、生成物溶出を蒸発光散乱によってモニタリングし、適切な画分を採集し、水 (500 mL) で希釈した。この溶液をクラマトグラフし (イオン交換、XK50Q、BIG ビーズ、300 mL、水酸化物形態、水の水 / 酢酸に対するグラジエント - 0.75 N)、適切な画分の pH を酢酸で 6.0 に低下させた。次いで、この溶液を逆相カラム (C-18 シリカ) で捕捉し、上記のメタノール / 水のグラジエントで溶出した。生成物画分をプールし、濃縮し、水中に再溶解し、凍結乾燥して 575 mg (70 %) の白色固体 (2) を得た。化合物の構造的データは次の通りであった。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz、D<sub>2</sub>O) 2.83 (t、2H、O-C-CH<sub>2</sub>-S)、2.95 (t、2H、O-C-CH<sub>2</sub>-S)、3.12 (q、1H、S-CHH-CHN)、3.39 (s、3H-CH<sub>3</sub>O)、3.71 (t、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) 生成物の純度は SDS PAGE によって確認された。

#### 【0341】

本明細書に記載の実施例および実施形態は例示目的に限定され、それに照らしてさまざまな修正または変更が当業者には示唆されており、かつ本出願の精神および範囲内ならびに添付の請求項の範囲内に含まれることが理解される。本明細書に引用されたすべての刊行物、特許、および特許出願は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書で援用される。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0342】

【図 1】本発明の実施において有用な代表的な修飾シアル酸ヌクレオチドを示す図である。A. 代表的な分岐 (例えば、30 kDa、40 kDa) CMP シアル酸 PEG 糖ヌクレオチドの構造。B. 線状 CMP シアル酸 PEG (例えば、10 kDa) の構造。

【図 2】PEG で誘導体化されたサッカリール部分を添加する前に G-CSF ペプチド上の炭水化物残基が GalNAc 部分を Thr 133 (メチオニンが存在する場合には Thr 134) におけるグリコシル残基に酵素的に添加することによって再構築される本発明の代表的な実施形態を示すスキームである。

【図 3】非 PEG 化 - G-CSF (A)、化学的 PEG 化 G-CSF (B)、および酵素的糖 PEG 化 G-CSF (C) のインビボ滞留寿命の比較を示す図である。

【図 4】図 3 に示されている種の活性の比較を示す図である。

【図 5】本発明のコンジュゲートの調製において使用される代表的な PEG グリコシル連結基前駆体 (修飾糖) を製造するための合成スキームを示す図である。

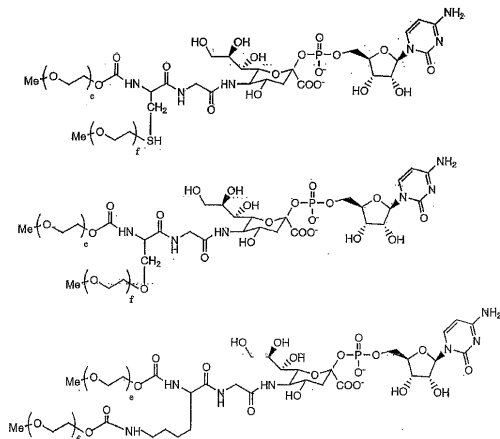
【図 6】代表的な G-CSF アミノ酸配列を示す図である。配列番号 1 は 175 アミノ酸変異形であり、ここで第 1 のアミノ酸はメチオニンであり、Thr 134 にはトレオニン残基がある。配列番号 2 は、主要なメチオニンが欠けていることを除き 175 アミノ酸変異形と同じ配列を有する 174 アミノ酸変異形であり、したがって、配列は T で始まり、位置 133 にはトレオニン残基がある。

【図 7】例えば、修飾シアル酸によりペプチドを糖 PEG 化する、本発明の糖コンジュゲートの形成において使用される代表的なシアルルトランスフェラーゼを示す表である。



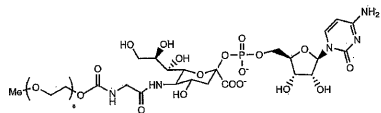
【図 1 A】

FIGURE 1A



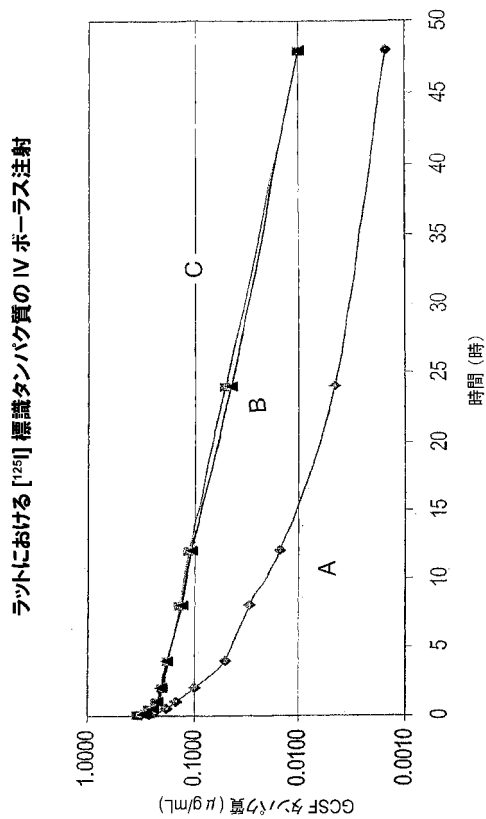
【図 1 B】

FIGURE 1B



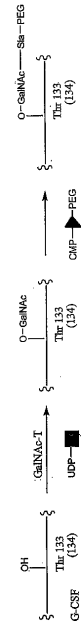
【図 3】

図 3



【図 2】

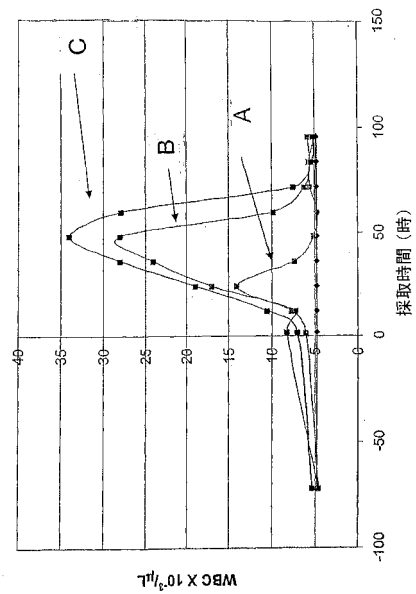
FIGURE 2



【図 4】

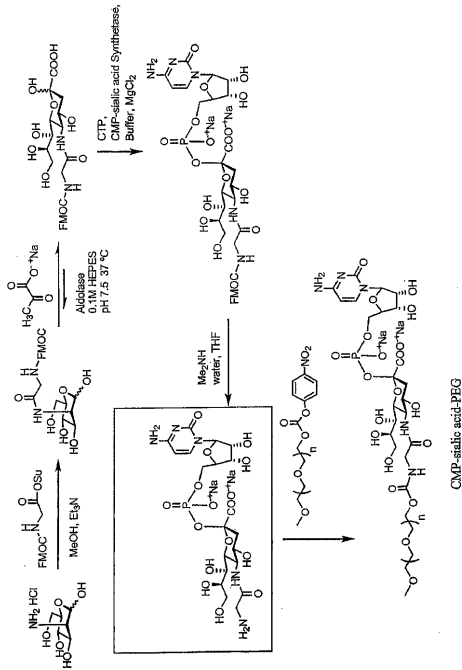
図 4

0 時間で静脈内投与された GCSF 変異形 (250 μg/Kg) に対するマウス WBC 反応



【図 5】

FIGURE 5



【図 6】

FIGURE 6

## 175 アミノ酸変異形

MTPLGPASSLPQSFLKLCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA  
 TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQAGCLS  
 QLHSLFLYQLLQALEGISPHLPTLDTLQDVADEFAT  
 TIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVV  
 VASHLQSFLEVSRYRVLRLHAQP (配列番号1).

## 174 アミノ酸変異形

TPLGPASSLPQSFLKLCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA  
 TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQAGCLS  
 QLHSLFLYQLLQALEGISPHLPTLDTLQDVADEFAT  
 TIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVV  
 VASHLQSFLEVSRYRVLRLHAQP (配列番号2).

【図 7 A】

FIGURE 7A

タンパク質	生物	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB
At1g09280	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AC011438 B1004593 NC_036070	Q84W00 Q9SGD2
At1g06660/F22013.14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AC009881 AY064135 AY124807 NC_030070 NM_180908	Q5VZJ0 Q5FRR9
At3g48820/T21J18_90	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AY080589 AY133816 AL132983 NM_114741	Q8RY00 Q9M301
α-2,3-sialyltransferase (ST3Gal-IV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ564673	CAE51392.1
α-2,3-sialyltransferase (ST3Gal-V)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ585768	CAE58580.1
α-2,6-sialyltransferase (Siat7b)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ620551	CAE58580.1
α-2,6-sialyltransferase (Siat8A)	<i>Bos taurus</i>	2.4.99.8	AJ699418	CAG27880.1
α-2,6-sialyltransferase (Siat8D)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ699421	CAG27883.1
α-2,6-sialyltransferase (Siat8E)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ704583	CAG28896.1
CMP α-2,6-sialyltransferase (ST6Gal I)	<i>Bos taurus</i>	2.4.99.1	Y15111 NM_177517	Q18974
sialyltransferase 6 (fragment)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AF450088	AAL47018.1
sialyltransferase ST3Gal-II (Siat4B)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748841	CAG44450.1
sialyltransferase ST3Gal-III (Siat6)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748842	CAG44451.1
sialyltransferase ST3Gal-IV (Siat10)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748843	CAG44452.1
ST3Gal I	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ305086	CAC24698.1
ST6GalNAc-VI	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ620949	CAF05586.1
CDS4	<i>Branchiostoma floridae</i>	n.d.	AF391289	AAM18873.1
polysialyltransferase (PST) (fragment)	<i>Cercopithecus aethiops</i>	2.4.99.-	AF210729	AAF17105.1
polysialyltransferase (STX) (fragment)	<i>Cercopithecus aethiops</i>	2.4.99.-	AF210318	AAF17104.1
α-2,3-sialyltransferase ST3Gal I (Siat4)	<i>Ciona intestinalis</i>	n.d.	AJ628815	CAF25173.1
α-2,3-sialyltransferase ST3Gal I (Siat4)	<i>Ciona savignyi</i>	n.d.	AJ628814	CAF25172.1
α-2,6-sialyltransferase ST3Gal IV	<i>Cricetulus griseus</i>	2.4.99.-	Z46801	AAE28634
Gal β-1,3/4-GlcNAc α-2,3-sialyltransferase ST3Gal I	<i>Cricetulus griseus</i>	n.d.	AY286675	AAP22942.1
Gal β-1,3/4-GlcNAc α-2,3-sialyltransferase ST3Gal II (fragment)	<i>Cricetulus griseus</i>	n.d.	AY286676	AAP22943.1
α-2,3-sialyltransferase ST3Gal I (Siat4)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783740	CAH04017.1
α-2,3-sialyltransferase ST3Gal I (Siat5)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783741	CAH04018.1

【図 7 B】

FIGURE 7B

タンパク質	生物	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB
α-2,3-sialyltransferase ST3Gal III (Siat6)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ626821	CAF25179.1
α-2,3-sialyltransferase ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ744909	CAG32846.1
α-2,3-sialyltransferase ST3Gal V-r (Siat5-related)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783742	CAH04019.1
α-2,6-sialyltransferase ST6Gal I (Siat1)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ744801	CAG32837.1
α-2,6-sialyltransferase ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ634459	CAG25680.1
α-2,6-sialyltransferase ST6GalNAc V (Siat7E) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ646874	CAG26703.1
α-2,6-sialyltransferase ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ646883	CAG26712.1
α-2,6-sialyltransferase ST6Gal I (Siat 8A) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715535	CAG29374.1
α-2,3-sialyltransferase ST6Gal III (Siat 8C) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715543	CAG29382.1
α-2,6-sialyltransferase ST6Gal IV (Siat 8D) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715545	CAG29384.1
α-2,6-sialyltransferase ST6Gal V (Siat 8E) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715546	CAG29385.1
α-2,6-sialyltransferase ST6Gal VI (Siat 8F) (fragment)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715551	CAG29390.1
β-galactosidase α-2,6-sialyltransferase II (ST6Gal II)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ627827	CAF29495.1
N-glycan α-2,6-sialyltransferase	<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC050483 AY055482 NM_163982	AAH60483.1 AAL17875.1 NP_705948.1
ST3Gal III-related (sialin)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC053179 AJ626820 NM_200355	AAH53179.1 CAF25178.1 NP_956649.1
ST3Gal-V	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ619980	CAF04061.1
ST6GalNAc-VI	<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC060932 AJ620947 AF003465	AAH60932.1 CAF06524.1 AAF47266.1
α-2,3-sialyltransferase (G4571) ST6Gal I	<i>Drosophila melanogaster</i>	2.4.99.1	AF218237 AF397532 AF003465 NM_079129 NM_166834	AAH13185.1 AAK92126.1 AAM70791.1 NP_523853.1 NP_729474.1
α-2,3-sialyltransferase (ST3Gal-VI)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ585767 AJ627204	CAE51391.1 CAF25503.1
α-2,3-sialyltransferase ST3Gal I	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.4	X80503 NM_205217	CAE56666.1 NP_990548.1
α-2,3-sialyltransferase ST3Gal IV (fragment)	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	AF036250	AAC14163.1
α-2,3-sialyltransferase (ST3Gal-II)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ585761	CAE51385.2
α-2,6-sialyltransferase (Siat7b)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ620653	CAF05852.1
α-2,6-sialyltransferase ST6Gal	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.1	X75558 NM_205241	CAE53235.1 NP_990572.1
α-2,6-sialyltransferase	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.3	AAE58026.1	Q92183

【図 7 C】

FIGURE 7C

タンパク質	生物	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
ST6GalNAc I			X74946 AAE68029.1 CAA52902.1 NM_205240 NP_990571.1	
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc II	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	X77775 AAE68030.1 CAA54813.1 NM_205238 NP_990564.1	Q92184
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc III (SIAT7C) (fragment)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ634455 CAQ25677.1	
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc V (SIAT7E) (fragment)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ646877 CAQ26706.1	
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase (GD3 Synthase) ST6Sia	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	U73176 AAC28888.1	P79763
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase (SIAT8B)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ698419 CAQ27851.1	
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase (SIAT8C)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ699420 CAQ27882.1	
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase (SIAT8F)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ699424 CAQ27888.1	
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST8Sia V (SIAT8C)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ704564 CAQ28697.1	
$\alpha$ -galactosamide $\alpha$ -2,6- sialyltransferase II (ST6Gal II)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ627629 CAF29497.1	
GM3 synthase (SIAT9)	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.9	AY152595 AA583519.1	
polysialyltransferase ST8Sia IV	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	AF008194 AAB95120.1	Q42399
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase ST3Gal I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	L29556 AAA36612.1 AF059321 AAC17874.1 L13972 AAC37574.1 AF165238 AAD39238.1 AF188191 AAH18357.1 NM_003033 NP_030242.1 NM_173344 NP_775475.1	Q11201 Q60677 G9UN51
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase ST3Gal II	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	U53090 AAB40360.1 BC036777 AAH36777.1 X96667 CAA65477.1 NM_006827 NP_008558.1	Q16842 Q00654
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase ST3Gal III (Sia7e)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.9	L23768 AAAS3778.1 BC050360 AAH50390.1 AF426851 AAO13859.1 AF425852 AAO13860.1 AF426853 AAO13861.1 AF425854 AAO13862.1 AF425855 AAO13863.1 AF425856 AAO13864.1 AF425857 AAO13865.1 AF425858 AAO13866.1 AF425859 AAO13867.1 AF425860 AAO13868.1 AF425861 AAO13869.1 AF425862 AAO13870.1 AF425863 AAO13871.1 AF425864 AAO13872.1 AF425865 AAO13873.1 AF425866 AAO13874.1 AF425867 AAO13875.1 AF425868 AAO13876.1 AF425869 AAO13877.1 AF425870 AAO13878.1 AF425871 AAO13879.1 AF425872 AAO13880.1 AF425873 AAO13881.1 AF425874 AAO13882.1 AF425875 AAO13883.1 AF425876 AAO13884.1 AF425877 AAO13885.1 AF425878 AAO13886.1 AF425879 AAO13887.1 AF425880 AAO13888.1 AF425881 AAO13889.1 AF425882 AAO13890.1 AF425883 AAO13891.1 AF425884 AAO13892.1 AF425885 AAO13893.1 AF425886 AAO13894.1 AF425887 AAO13895.1 AF425888 AAO13896.1 AF425889 AAO13897.1 AF425890 AAO13898.1 AF425891 AAO13899.1 AF425892 AAO13900.1 AF425893 AAO13901.1 AF425894 AAO13902.1 AF425895 AAO13903.1 AF425896 AAO13904.1 AF425897 AAO13905.1 AF425898 AAO13906.1 AF425899 AAO13907.1 AF425900 AAO13908.1 AF425901 AAO13909.1 AF425902 AAO13910.1 AF425903 AAO13911.1 AF425904 AAO13912.1 AF425905 AAO13913.1 AF425906 AAO13914.1 AF425907 AAO13915.1 AF425908 AAO13916.1 AF425909 AAO13917.1 AF425910 AAO13918.1 AF425911 AAO13919.1 AF425912 AAO13920.1 AF425913 AAO13921.1 AF425914 AAO13922.1 AF425915 AAO13923.1 AF425916 AAO13924.1 AF425917 AAO13925.1 AF425918 AAO13926.1 AF425919 AAO13927.1 AF425920 AAO13928.1 AF425921 AAO13929.1 AF425922 AAO13930.1 AF425923 AAO13931.1 AF425924 AAO13932.1 AF425925 AAO13933.1 AF425926 AAO13934.1 AF425927 AAO13935.1 AF425928 AAO13936.1 AF425929 AAO13937.1 AF425930 AAO13938.1 AF425931 AAO13939.1 AF425932 AAO13940.1 AF425933 AAO13941.1 AF425934 AAO13942.1 AF425935 AAO13943.1 AF425936 AAO13944.1 AF425937 AAO13945.1 AF425938 AAO13946.1 AF425939 AAO13947.1 AF425940 AAO13948.1 AF425941 AAO13949.1 AF425942 AAO13950.1 AF425943 AAO13951.1 AF425944 AAO13952.1 AF425945 AAO13953.1 AF425946 AAO13954.1 AF425947 AAO13955.1 AF425948 AAO13956.1 AF425949 AAO13957.1 AF425950 AAO13958.1 AF425951 AAO13959.1 AF425952 AAO13960.1 AF425953 AAO13961.1 AF425954 AAO13962.1 AF425955 AAO13963.1 AF425956 AAO13964.1 AF425957 AAO13965.1 AF425958 AAO13966.1 AF425959 AAO13967.1 AF425960 AAO13968.1 AF425961 AAO13969.1 AF425962 AAO13970.1 AF425963 AAO13971.1 AF425964 AAO13972.1 AF425965 AAO13973.1 AF425966 AAO13974.1 AF425967 AAO13975.1 AF425968 AAO13976.1 AF425969 AAO13977.1 AF425970 AAO13978.1 AF425971 AAO13979.1 AF425972 AAO13980.1 AF425973 AAO13981.1 AF425974 AAO13982.1 AF425975 AAO13983.1 AF425976 AAO13984.1 AF425977 AAO13985.1 AF425978 AAO13986.1 AF425979 AAO13987.1 AF425980 AAO13988.1 AF425981 AAO13989.1 AF425982 AAO13990.1 AF425983 AAO13991.1 AF425984 AAO13992.1 AF425985 AAO13993.1 AF425986 AAO13994.1 AF425987 AAO13995.1 AF425988 AAO13996.1 AF425989 AAO13997.1 AF425990 AAO13998.1 AF425991 AAO13999.1 AF425992 AAO14000.1 AF425993 AAO14001.1 AF425994 AAO14002.1 AF425995 AAO14003.1 AF425996 AAO14004.1 AF425997 AAO14005.1 AF425998 AAO14006.1 AF425999 AAO14007.1 AF426000 AAO14008.1 AF426001 AAO14009.1 AF426002 AAO14010.1 AF426003 AAO14011.1 AF426004 AAO14012.1 AF426005 AAO14013.1 AF426006 AAO14014.1 AF426007 AAO14015.1 AF426008 AAO14016.1 AF426009 AAO14017.1 AF426010 AAO14018.1 AF426011 AAO14019.1 AF426012 AAO14020.1 AF426013 AAO14021.1 AF426014 AAO14022.1 AF426015 AAO14023.1 AF426016 AAO14024.1 AF426017 AAO14025.1 AF426018 AAO14026.1 AF426019 AAO14027.1 AF426020 AAO14028.1 AF426021 AAO14029.1 AF426022 AAO14030.1 AF426023 AAO14031.1 AF426024 AAO14032.1 AF426025 AAO14033.1 AF426026 AAO14034.1 AF426027 AAO14035.1 AF426028 AAO14036.1 AF426029 AAO14037.1 AF426030 AAO14038.1 AF426031 AAO14039.1 AF426032 AAO14040.1 AF426033 AAO14041.1 AF426034 AAO14042.1 AF426035 AAO14043.1 AF426036 AAO14044.1 AF426037 AAO14045.1 AF426038 AAO14046.1 AF426039 AAO14047.1 AF426040 AAO14048.1 AF426041 AAO14049.1 AF426042 AAO14050.1 AF426043 AAO14051.1 AF426044 AAO14052.1 AF426045 AAO14053.1 AF426046 AAO14054.1 AF426047 AAO14055.1 AF426048 AAO14056.1 AF426049 AAO14057.1 AF426050 AAO14058.1 AF426051 AAO14059.1 AF426052 AAO14060.1 AF426053 AAO14061.1 AF426054 AAO14062.1 AF426055 AAO14063.1 AF426056 AAO14064.1 AF426057 AAO14065.1 AF426058 AAO14066.1 AF426059 AAO14067.1 AF426060 AAO14068.1 AF426061 AAO14069.1 AF426062 AAO14070.1 AF426063 AAO14071.1 AF426064 AAO14072.1 AF426065 AAO14073.1 AF426066 AAO14074.1 AF426067 AAO14075.1 AF426068 AAO14076.1 AF426069 AAO14077.1 AF426070 AAO14078.1 AF426071 AAO14079.1 AF426072 AAO14080.1 AF426073 AAO14081.1 AF426074 AAO14082.1 AF426075 AAO14083.1 AF426076 AAO14084.1 AF426077 AAO14085.1 AF426078 AAO14086.1 AF426079 AAO14087.1 AF426080 AAO14088.1 AF426081 AAO14089.1 AF426082 AAO14090.1 AF426083 AAO14091.1 AF426084 AAO14092.1 AF426085 AAO14093.1 AF426086 AAO14094.1 AF426087 AAO14095.1 AF426088 AAO14096.1 AF426089 AAO14097.1 AF426090 AAO14098.1 AF426091 AAO14099.1 AF426092 AAO14100.1 AF426093 AAO14101.1 AF426094 AAO14102.1 AF426095 AAO14103.1 AF426096 AAO14104.1 AF426097 AAO14105.1 AF426098 AAO14106.1 AF426099 AAO14107.1 AF426100 AAO14108.1 AF426101 AAO14109.1 AF426102 AAO14110.1 AF426103 AAO14111.1 AF426104 AAO14112.1 AF426105 AAO14113.1 AF426106 AAO14114.1 AF426107 AAO14115.1 AF426108 AAO14116.1 AF426109 AAO14117.1 AF426110 AAO14118.1 AF426111 AAO14119.1 AF426112 AAO14120.1 AF426113 AAO14121.1 AF426114 AAO14122.1 AF426115 AAO14123.1 AF426116 AAO14124.1 AF426117 AAO14125.1 AF426118 AAO14126.1 AF426119 AAO14127.1 AF426120 AAO14128.1 AF426121 AAO14129.1 AF426122 AAO14130.1 AF426123 AAO14131.1 AF426124 AAO14132.1 AF426125 AAO14133.1 AF426126 AAO14134.1 AF426127 AAO14135.1 AF426128 AAO14136.1 AF426129 AAO14137.1 AF426130 AAO14138.1 AF426131 AAO14139.1 AF426132 AAO14140.1 AF426133 AAO14141.1 AF426134 AAO14142.1 AF426135 AAO14143.1 AF426136 AAO14144.1 AF426137 AAO14145.1 AF426138 AAO14146.1 AF426139 AAO14147.1 AF426140 AAO14148.1 AF426141 AAO14149.1 AF426142 AAO14150.1 AF426143 AAO14151.1 AF426144 AAO14152.1 AF426145 AAO14153.1 AF426146 AAO14154.1 AF426147 AAO14155.1 AF426148 AAO14156.1 AF426149 AAO14157.1 AF426150 AAO14158.1 AF426151 AAO14159.1 AF426152 AAO14160.1 AF426153 AAO14161.1 AF426154 AAO14162.1 AF426155 AAO14163.1 AF426156 AAO14164.1 AF426157 AAO14165.1 AF426158 AAO14166.1 AF426159 AAO14167.1 AF426160 AAO14168.1 AF426161 AAO14169.1 AF426162 AAO14170.1 AF426163 AAO14171.1 AF426164 AAO14172.1 AF426165 AAO14173.1 AF426166 AAO14174.1 AF426167 AAO14175.1 AF426168 AAO14176.1 AF426169 AAO14177.1 AF426170 AAO14178.1 AF426171 AAO14179.1 AF426172 AAO14180.1 AF426173 AAO14181.1 AF426174 AAO14182.1 AF426175 AAO14183.1 AF426176 AAO14184.1 AF426177 AAO14185.1 AF426178 AAO14186.1 AF426179 AAO14187.1 AF426180 AAO14188.1 AF426181 AAO14189.1 AF426182 AAO14190.1 AF426183 AAO14191.1 AF426184 AAO14192.1 AF426185 AAO14193.1 AF426186 AAO14194.1 AF426187 AAO14195.1 AF426188 AAO14196.1 AF426189 AAO14197.1 AF426190 AAO14198.1 AF426191 AAO14199.1 AF426192 AAO14200.1 AF426193 AAO14201.1 AF426194 AAO14202.1 AF426195 AAO14203.1 AF426196 AAO14204.1 AF426197 AAO14205.1 AF426198 AAO14206.1 AF426199 AAO14207.1 AF426200 AAO14208.1 AF426201 AAO14209.1 AF426202 AAO14210.1 AF426203 AAO14211.1 AF426204 AAO14212.1 AF426205 AAO14213.1 AF426206 AAO14214.1 AF426207 AAO14215.1 AF426208 AAO14216.1 AF426209 AAO14217.1 AF426210 AAO14218.1 AF426211 AAO14219.1 AF426212 AAO14220.1 AF426213 AAO14221.1 AF426214 AAO14222.1 AF426215 AAO14223.1 AF426216 AAO14224.1 AF426217 AAO14225.1 AF426218 AAO14226.1 AF426219 AAO14227.1 AF426220 AAO14228.1 AF426221 AAO14229.1 AF426222 AAO14230.1 AF426223 AAO14231.1 AF426224 AAO14232.1 AF426225 AAO14233.1 AF426226 AAO14234.1 AF426227 AAO14235.1 AF426228 AAO14236.1 AF426229 AAO14237.1 AF426230 AAO14238.1 AF426231 AAO14239.1 AF426232 AAO14240.1 AF426233 AAO14241.1 AF426234 AAO14242.1 AF426235 AAO14243.1 AF426236 AAO14244.1 AF426237 AAO14245.1 AF426238 AAO14246.1 AF426239 AAO14247.1 AF426240 AAO14248.1 AF426241 AAO14249.1 AF426242 AAO14250.1 AF426243 AAO14251.1 AF426244 AAO14252.1 AF426245 AAO14253.1 AF426246 AAO14254.1 AF426247 AAO14255.1 AF426248 AAO14256.1 AF426249 AAO14257.1 AF426250 AAO14258.1 AF426251 AAO14259.1 AF426252 AAO14260.1 AF426253 AAO14261.1 AF426254 AAO14262.1 AF426255 AAO14263.1 AF426256 AAO14264.1 AF426257 AAO14265.1 AF426258 AAO14266.1 AF426259 AAO14267.1 AF426260 AAO14268.1 AF426261 AAO14269.1 AF426262 AAO14270.1 AF426263 AAO14271.1 AF426264 AAO14272.1 AF426265 AAO14273.1 AF426266 AAO14274.1 AF426267 AAO14275.1 AF426268 AAO14276.1 AF426269 AAO14277.1 AF426270 AAO14278.1 AF426271 AAO14279.1 AF426272 AAO14280.1 AF426273 AAO14281.1 AF426274 AAO14282.1 AF426275 AAO14283.1 AF426276 AAO14284.1 AF426277 AAO14285.1 AF426278 AAO14286.1 AF426279 AAO14287.1 AF426280 AAO14288.1 AF426281 AAO14289.1 AF426282 AAO14290.1 AF426283 AAO14291.1 AF426284 AAO14292.1 AF426285 AAO14293.1 AF426286 AAO14294.1 AF426287 AAO14295.1 AF426288 AAO14296.1 AF426289 AAO14297.1 AF426290 AAO14298.1 AF426291 AAO14299.1 AF426292 AAO14300.1 AF426293 AAO14301.1 AF426294 AAO14302.1 AF426295 AAO14303.1 AF426296 AAO14304.1 AF426297 AAO14305.1 AF426298 AAO14306.1 AF426299 AAO14307.1 AF426300 AAO14308.1 AF426301 AAO14309.1 AF426302 AAO14310.1 AF426303 AAO14311.1 AF426304 AAO14312.1 AF426305 AAO14313.1 AF426306 AAO14314.1 AF426307 AAO14315.1 AF426308 AAO14316.1 AF426309 AAO14317.1 AF426310 AAO14318.1 AF426311 AAO14319.1 AF426312 AAO14320.1 AF426313 AAO14321.1 AF426314 AAO14322.1 AF426315 AAO14323.1 AF426316 AAO14324.1 AF426317 AAO14325.1 AF426318 AAO14326.1 AF426319 AAO14327.1 AF426320 AAO14328.1 AF426321 AAO14329.1 AF426322 AAO14330.1 AF426323 AAO14331.1 AF426324 AAO14332.1 AF426325 AAO14333.1 AF426326 AAO14334.1 AF426327 AAO14335.1 AF426328 AAO14336.1 AF426329 AAO14337.1 AF426330 AAO14338.1 AF426331 AAO14339.1 AF426332 AAO14340.1 AF426333 AAO14341.1 AF426334 AAO14342.1 AF426335 AAO14343.1 AF426336 AAO14344.1 AF426337 AAO14345.1 AF426338 AAO14346.1 AF426339 AAO14347.1 AF426340 AAO14348.1 AF426341 AAO14349.1 AF426342 AAO14350.1 AF426343 AAO14351.1 AF426344 AAO14352.1 AF426345 AAO14353.1 AF426346 AAO14354.1 AF426347 AAO14355.1 AF426348 AAO14356.1 AF426349 AAO14357.1 AF426350 AAO14358.1 AF426351 AAO14359.1 AF426352 AAO14360.1 AF426353 AAO14361.1 AF426354 AAO14362.1 AF426355 AAO14363.1 AF426356 AAO14364.1 AF426357 AAO14365.1 AF426358 AAO14366.1 AF426359 AAO14367.1 AF426360 AAO14368.1 AF426361 AAO14369.1 AF426362 AAO14370.1 AF426363 AAO14371.1 AF426364 AAO14372.1 AF426365 AAO14373.1 AF426366 AAO14374.1 AF426367 AAO14375.1 AF426368 AAO14376.1 AF426369 AAO14377.1 AF426370 AAO14378.1 AF426371 AAO14379.1 AF426372 AAO14380.1 AF426373 AAO14381.1 AF426374 AAO14382.1 AF426375 AAO14383.1 AF426376 AAO14384.1 AF426377 AAO14385.1 AF426378 AAO14386.1 AF426379 AAO14387.1 AF426380 AAO14388.1 AF426381 AAO14389.1 AF426382 AAO143	

## 【図 7 G】

FIGURE 7G

タンパク質	生物	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc IV	<i>St6galnac4</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.7	NM_011372 NP_035502 BC056461 AAH66451.1 AK085730 BAC39823.1 AJ007310 CAA07446.1 Y15779 CAB43507.1 Y15780 CAB43514.1 Y15055 CAB89346.1 Y18057 CAB89348.1 NM_011373 NP_035503.1	Q8C3J2 Q8JHP2 Q8P286 Q8B725 Q8JHP0 Q8QUP9 Q8R2B5
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase (GD3 synthase) ST8Sia	<i>St8sia1</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	L38877 AAA91389.1 BC024821 AAH24821.1 AK046188 BAC32625.1 AK052444 BAC34994.1 X84235 CAA58014.1 AJ401102 CAC20708.1 NM_011374 NP_035504.1	Q64468 Q64687 Q8BL76 Q8BW10 Q8K1C1 Q8EPC0
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase (ST8Sia VI)	<i>St8sia6</i> <i>Mus musculus</i>	n.d.	AB059554 BAC01265.1 AK085105 BAC39937.1 NM_145636 NP_059937.1	Q8B143 Q8K4T1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST8Sia II	<i>St8sia2</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.	X83562 CAA58548.1 X99546 CAA67965.1 X99547 CAA67965.1 X99548 CAA67965.1 X99549 CAA67965.1 X99550 CAA67965.1 X99551 CAA67965.1 NM_039181 NP_033207.1	Q36966
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST8Sia IV	<i>St8sia4</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	BC060112 AAH50112.1 AK003690 BAB2941.1 AK041723 BAC31044.1 AJ223956 CAA11685.1 X88000 CAA59932.1 Y09484 CAA70592.1 NM_009189 NP_033208.1	Q64682 Q8BY70
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST8Sia V	<i>St8sia5</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.	BC034855 AAH34855.1 AK078670 BAC37354.1 X98014 CAA66642.1 X98014 CAA66643.1 X98014 CAA66644.1 NM_013666 NP_036941.1 NM_153124 NP_064764.1 NM_177416 NP_083135.1	P70126 P70127 P70128 Q8BJW0 Q8JZ03
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST8Sia III	<i>St8sia3</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.	BC076645 AAH75645.1 AK015974 BAB30012.1 X90502 CAA56665.1 NM_009182 NP_033206.1	Q64689 Q8CUJ6
GD1 synthase (ST6GalNAc V)	<i>St6galnac5</i> <i>Mus musculus</i>	n.d.	BC055737 AAH55737.1 AB030836 BAA85747.1 AB028840 BAA82952.1 AK034937 BAC26633.1 AK038434 BAC29697.1 AK042683 BAC31331.1 NM_012028 NP_036158.2	Q8CAM7 Q8CBX1 Q8GYJ1 Q8R0K6
GM3 synthase ( $\alpha$ -2,3-sialyltransferase) ST3Gal V	<i>St3gal5</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.9	AF119416 AAF66147.1 AB011841 AAP50563.1 AB018048 BAA33491.1 AB013302 BAA76467.1 AK012961 BAA28571.1 Y15003 CAA75235.1 NM_011375 NP_035505.1 BC035895 AAF66965.1 AB035174 BAA7036.1 AB035123 BAA9540.1 AK030648 BAC27064.1	Q88829 Q8CZ85 Q9QWF9 Q8ZWC3 Q8JMR5 Q9R0G9
N-acetylglactosaminide $\alpha$ -2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc VI)	<i>St6galnac6</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.		

## 【図 7 H】

FIGURE 7H

タンパク質	生物	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
M138L	<i>Myxoma virus</i>	n.d.	NM_016973 NP_058699.1 U46578 AAD00069.1 AF170726 AAE61323.1 NC_001132 AAE61326.1 AAAF15026.1 NP_051852.1	CAE51384.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase (ST3Gal-I)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AJ585760	CAF05648.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase (Siat7A)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AJ620649	Q7T2X5
$\alpha$ -2,3-polySialyltransferase IV (ST3Sia IV)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AB094402	Q7T2X4
GalNAc $\alpha$ -2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AB097943	Q7T2X4
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase ST3Gal IV	<i>Oryzias latipes</i>	2.4.99.	AF121967	Q6N257
OJ1217_F02.7	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	n.d.	AP004084	BAD07616.1
OSJNB004034.2.2 or OSJNB0002J11.9	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	n.d.	AL731626	CAD41185.1 CAE04714.1
P0683G2.18 or P0469B03.1	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	n.d.	AP003289	BAB63715.1 BAB90552.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc V (Siat7E) (fragment)	<i>Oryzias latipes</i>	n.d.	AJ646876	CAG26705.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase ST3Gal I (Siat4)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744803	CAG32839.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase ST3Gal II (Siat5)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744904	CAG32840.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase ST3Gal III (Siat6)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ626819	CAF25177.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ626824	CAF25182.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase ST3Gal V (Siat10)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744908	CAG32844.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase (Siat7A)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ746740	CAG38615.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase (Siat7B)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ748741	CAG38616.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc II (Siat7C) (fragment)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ634454	CAG25676.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc V (Siat7E) (fragment)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646875	CAG26704.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragment)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646882	CAG26711.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase 8A (Siat8A)	<i>Pan troglodytes</i>	2.4.99.9	AJ697658	CAG26896.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase 8B (Siat8B)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697659	CAG26897.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase 8C (Siat8C)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697660	CAG26898.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase 8D (Siat8D)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697661	CAG26899.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697662	CAG26900.1

## 【図 7 I】

FIGURE 7I

タンパク質	生物	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
8E (Siat8E)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697663	CAG26901.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase 8F (Siat8F)	<i>Pan troglodytes</i>	2.4.99.1	AJ627624	CAF29492.1
$\beta$ -galactosaminide $\alpha$ -2,6-sialyltransferase I (ST6Gal I; Siat1)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ627625	CAF29493.1
$\beta$ -galactosaminide $\alpha$ -2,6-sialyltransferase II (ST6Gal II)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744607	CAG32843.1
GM3 synthase ST3Gal V (Siat9)	<i>Rabbit fibroma virus Kasza</i>	n.d.	NC_001268	NP_052025
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase ST3Gal III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.6	M97754 AAA42146.1 NM_031697 NP_113885.1	Q02734
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ626825	CAF25183.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase ST3Gal VI	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ626743	CAF25053.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST3Gal II	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.	X76983 CAA54293.1 NM_031696 NP_113883.1	Q11205
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6Gal I	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.1	M18769 AAA41186.1 M83143 AAB07233.1	P13721
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc I (Siat7A)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ634458	CAG25684.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ634457	CAG25679.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.	L29654 AAC42066.1 BC072501 AAH72501.1 NM_019123 NP_061996.1	Q64686
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc IV (Siat7D) (fragment)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646871	CAG26700.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc V (Siat7E)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646872	CAG26701.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragment)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646881	CAG26710.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase (GD3 synthase) ST8Sia I	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.	U53883 AAC27541.1 D45258 BAA08213.1	P70554 P97713
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase (Siat7B)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ699422	CAG27884.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase (Siat7B)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ699423	CAG27885.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST8Sia II	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.	L13445 AAA42147.1 NM_057158 NP_479497.1	Q07977 Q64688
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST8Sia III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.	U55638 AA950061.1 NM_013029 NP_037161.1	P97877
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST8Sia IV	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.	U90215 AAB49989.1	Q08583
$\beta$ -galactosaminide $\alpha$ -2,6-sialyltransferase II (ST6Gal II)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ627626	CAF29494.1
GM3 synthase ST3Gal V	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AB018049 BAA33492.1 NM_031637 NP_112827.1	Q08830

## 【図 7 J】

FIGURE 7J

タンパク質	生物	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB / 3D
sialyltransferase ST3Gal-I (Siat4A)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ746840	CAG44449.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase (ST3Gal-II)	<i>Silurana tropicalis</i>	n.d.	AJ585763	CAE51387.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase (Siat7B)	<i>Silurana tropicalis</i>	n.d.	AJ620650	CAF05849.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase (ST6galnac)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	n.d.	AJ696425	CAG27887.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase (ST3Gal-III)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ585765	CAE51389.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase (ST3Gal-IV)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ584974	CAE48299.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase ST3Gal I	<i>Sus scrofa</i>	2.4.99.4	M97753	AAA31125.1 Q02745
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase (fragment) ST6Gal I	<i>Sus scrofa</i>	2.4.99.1	AF136748	AAD30659.1 Q9XSG8
$\beta$ -galactosaminide $\alpha$ -2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc-V)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ620948	CAF05645.2
sialyltransferase (fragment) ST6Gal I	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AF041031	AAC15633.1 Q62717
ST6GALNAc-V	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ620948	CAF05655.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase (Siat5-1)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ744305	CAG32841.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase ST3Gal I (Siat4)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626816	CAF25174.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase ST3Gal II (Siat5)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626817	CAF25175.1
$\alpha$ -2,3-sialyltransferase ST3Gal III (Siat6)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626818	CAF25176.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6Gal I (Siat1)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ744300	CAG32836.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634460	CAG25681.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc II B (Siat7B-related)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634461	CAG25682.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc III (Siat7C) (fragment)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634466	CAG25678.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc IV (Siat7D) (fragment)	<i>Takifugu rubripes</i>	2.4.99.3	Y17466	CAB44338.1 Q9W6U6
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc V (Siat7E) (fragment)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ646873	CAG26702.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragment)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ646880	CAG26709.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST8Sia I (Siat 8A) (fragment)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715534	CAG29373.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST8Sia II (Siat 8B) (fragment)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715536	CAG29377.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST8Sia III (Siat 8C) (fragment)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715541	CAG29380.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST8Sia IIIr (Siat 8Cr)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715542	CAG29381.1
$\alpha$ -2,6-sialyltransferase ST8Sia V (Siat 8E)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715547	CAG29386.1



【配列表】

0004951527000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	9/04	(2006.01)	A 6 1 P 9/04
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 A

(31)優先権主張番号 60/674,199  
 (32)優先日 平成17年4月22日(2005.4.22)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/684,851  
 (32)優先日 平成17年5月25日(2005.5.25)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 11/166,404  
 (32)優先日 平成17年6月23日(2005.6.23)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ゴフ,デービッド,エー.  
 アメリカ合衆国,ペンシルバニア州 1 9 0 8 7,ウェーン,ビーチツリー レーン 5 6 0  
 (72)発明者 ボウエ,キャリン  
 アメリカ合衆国,ペンシルバニア州 1 8 9 0 1,ドイルスタウン,チェリー レーン 2 7 6  
 (72)発明者 トウテ,スザン  
 アメリカ合衆国,ペンシルバニア州 1 9 4 5 4,ペンスバーク,イースト バック ロード 3  
 3 7 4  
 (72)発明者 フェロ,マイケル  
 アメリカ合衆国,ペンシルバニア州 1 9 0 8 3,ヘイバータウン,ガーフィールド アベニュー  
 1 1 1 0  
 (72)発明者 ウィレット,ウォルター,エス.  
 アメリカ合衆国,ペンシルバニア州 1 8 9 0 1,ドイルスタウン,コムリー サークル 3 8 2  
 0

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 特表2007-513189(JP,A)  
 国際公開第2003/031464(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)  
 C07K 14/00